

JULIANA HEY CORADIN

MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
SOBRE SUPERFÍCIES ÚMIDAS E NUTRITIVAS EM CONTATO COM O AR

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

CURITIBA
2010

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ
Setor de Tecnologia

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e sete dias do mês de agosto de 2010, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, no Centro Politécnico – UFPR foi instalada pelo Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Júnior, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, a Banca Examinadora para a décima quarta defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos. Estiveram presentes no ato, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo a determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, foi constituída pelos professores doutores: David Alexander Mitchell (PPGEQ/UFPR); Fernanda de Castilhos (PPGEQ/UFPR); Ricardo de Andrade Medronho (DEQ/UFRJ) às 9:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Juliana Hey Coradin** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “*Modelagem Matemática do Crescimento de Fungos Filamentosos sobre Superfícies Úmidas e Nutritivas em Contato com o Ar*”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela APROVAÇÃO da candidata, (de acordo com a determinação dos artigos 62 e 63 da resolução 62/03 de 22.07.2003).

Curitiba, 27 de agosto de 2010.

Prof. Dr. David Alexander Mitchell
(PPGEQ/UFPR) – Orientador

Prof.^a. Dr.^a. Fernanda de Castilhos
(PPGEQ/UFPR) – Membro

Prof. Dr. Ricardo de Andrade Medronho
(DEQ/UFRJ) – Membro

*A meus pais e a meu irmão,
pelo amor e apoio sem limites.*

AGRADECIMENTOS

“Devemos agradecer às pessoas que nos fazem felizes... São elas os jardineiros encantadores que fazem nossas almas florescerem!”

(Marcel Proust)

Ao meu orientador, Prof. David A. Mitchell, por toda a liberdade e apoio a mim concedidos, e por toda confiança em mim depositada desde as primeiras aulas de Bioquímica da graduação, agradeço. Por sempre acreditar na minha capacidade (muitas vezes mais do que eu mesma), pelos sábios conselhos sobre ciência e sobre a vida, serei sempre grata.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, em especial aos alunos de iniciação científica Francisco e Aline e à pós-doutoranda Graciele, que fizeram contribuições decisivas para o andamento da dissertação. Um agradecimento também aos doutorandos Wellington e Diniara, pelas conversas esporádicas, mas oportunas.

Aos colegas do PPGEQ, agradeço pelos bons momentos compartilhados. Um agradecimento em especial à Fulvy, que sempre esteve presente nos momentos que precisei e que foi uma grande amiga no decorrer do mestrado. À Coordenação do PPGEQ e à UFPR, agradeço por proporcionarem um ensino de qualidade e de valor para a sociedade. Agradeço igualmente à CAPES, pelo apoio financeiro.

Em nome da Prof.^a Leda dos Reis Castilho, chefe do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares – LECC, da COPPE, UFRJ, agradeço sinceramente a *todos* os amigos que lá fiz pelo apoio recebido nos oito meses em que lá estive presente durante a realização do mestrado. Por me receberem tão bem no mundo carioca, estarei sempre em dívidas!

Aos Engenheiros de Bioprocessos e Biotecnologistas da turma de 2008 e agregados (são muitos para citar nomes!), sempre presentes, reconheço a importância que têm na minha profissão e na minha vida, e agradeço o apoio contínuo.

A toda minha família, agradeço pelo carinho! Aos meus pais, Cléa e Valderico, faltam palavras para expressar a gratidão. Ao meu irmão, Rafael, igualmente. Foram eles que sempre me apoiaram nas decisões e indecisões durante toda a minha vida, e principalmente estiveram presentes nos períodos críticos durante a realização deste trabalho. Agradecer é pouco!

E agradeço a Deus, pela constante inspiração...

*“O que faz andar o barco não é a vela
enfunada, mas o vento que não se vê.”*

(Platão)

RESUMO

O crescimento de fungos filamentosos sobre superfícies úmidas e nutritivas em contato com o ar é um fenômeno importante em processos de grande destaque, como na fermentação no estado sólido (FES) e na decomposição da matéria orgânica. Ele ocorre por meio do aumento de biomassa através de estruturas fúngicas individuais que se assemelham a “tubos” microscópicos, conhecidas como hifas. Dentro delas ocorre um conjunto de fenômenos físicos e biológicos que já estão bem caracterizados isoladamente, mas que pouco se sabe sobre como interagem. Entender a interação entre os fenômenos é fundamental para compreender como ocorre a distribuição da biomassa acima das superfícies destes sistemas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi de desenvolver um sistema matemático que permitisse estudar os diversos fenômenos físicos e biológicos importantes no crescimento de fungos filamentosos sobre a superfície de meios úmidos e nutritivos em contato com o ar. Dois submodelos foram desenvolvidos: primeiro, foi desenvolvido um modelo discreto para o crescimento do micélio fúngico no espaço aéreo acima da superfície de inoculação. Nele, cada hifa era representada por um conjunto de cubos alinhados no espaço tridimensional. Foi proposta a existência de dois tipos de biomassa: uma chamada vegetativa, bastante ramificada e que crescia em pequenas alturas até o momento da diferenciação; e a outra chamada de reprodutiva, menos ramificada, mais veloz e que crescia após o momento da diferenciação. Ao longo do crescimento, se uma hifa se encostasse em outra, ela poderia se redirecionar algumas vezes, porém em um número limitado de vezes até se tornar inativa. A incorporação dessas biomassas e do número limitado de redirecionamentos foi fundamental para que o modelo descrevesse razoavelmente os dados experimentais disponíveis na literatura, onde o perfil era de uma alta densidade de biomassa decrescendo até 1 mm de altura e uma densidade baixa e constante até 3,5 mm. Foi também demonstrado que o sistema é flexível o suficiente para que regras sejam alteradas ou adicionadas para simular outras situações. Segundo, foi desenvolvido um modelo para simular o crescimento de uma única hifa como um conjunto de tanques em série. Foram incorporadas a difusão intracelular de glucose e a evaporação de água pela ponta da hifa, a qual gerava um fluxo convectivo de líquido dentro dela. Com isso, a glucose era transportada a partir do início da hifa até à ponta, local onde ocorriam reações para sustentar o crescimento. O modelo mostrou que apenas com a difusão os nutrientes chegavam até a ponta a uma velocidade tal que a hifa estendia até 1 mm de altura nas 40 h simuladas. Por outro lado, com fluxo convectivo, a velocidade de translocação de nutrientes aumentava, a glucose chegava mais rapidamente até à ponta e a hifa alongava mais rapidamente, chegando até a uma altura de 3,5 mm em 40 h de simulação. O modelo foi calibrado de modo que possa ser incorporado ao modelo do crescimento do micélio, e então um modelo que reúna e integre a distribuição espacial da biomassa e translocação de nutrientes possa ser desenvolvido.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Modelagem matemática. Autômatos celulares.

Tanques em série. Translocação de nutrientes.

ABSTRACT

The growth of filamentous fungi on the surfaces of solid nutrient particles that are surrounded by an air phase is important in natural processes such as the degradation of organic matter and artificial cultivation processes such as solid-state fermentation. This growth occurs in the form of microscopic tubules, known as hyphae. The various biological and physical phenomena that occur within hyphae have been studied, but little is known about how they interact to control hyphal growth. An understanding of these interactions would lay the basis for understanding the distribution patterns of aerial hyphae within these systems. In this context, the objective of the current work was to develop a mathematical system for investigating the interactions amongst the various physical and biological phenomena that occur within aerial hyphae growing on moist solid nutritive surfaces in contact with an air phase. Two submodels were developed. In the first part of the work, a discrete model was developed to describe the growth of a fungal mycelium into the air space above a solid surface inoculated with spores. In this model, each hypha is represented by a set of contiguous cubes within a three dimensional control volume. Two types of biomass are included in the model: Vegetative biomass grows in a highly branched manner, occupying the air space near to the surface until the time of differentiation, after which reproductive hyphae, which extend more quickly and branch less frequently, grow away from the solid surface. During growth, if a hyphal tip bumps into a pre-existing hypha, it can choose another growth direction. However, if this happens several times, then the hyphal tip becomes inactive and that hypha ceases to extend. The incorporation of two types of biomass and rules for inactivation of hyphal tips was necessary in order for the model to be able to describe literature data for the density of aerial hyphae. These data show a high density of biomass until 1 mm above the surface and then a low biomass density up to 3.5 mm. The model system can easily be adapted with the incorporation of new rules in order to describe mycelial growth in other situations. In the second part of the work, a model, based on the n-tanks-in-series approach, was developed to simulate the growth of a single aerial hypha. The model describes intracellular diffusion of glucose and the evaporation of water from the hyphal tip, with this evaporation causing a convective flow within the hypha. In this manner, glucose is transported from the beginning of the hypha to the tip, where the reactions supporting hyphal extension occur. Simulations with the model suggest that if diffusion were the only mechanism by which nutrients reached the hyphal tip, then the hypha would only extend 1 mm over a 40 h period. On the other hand, with convective flow, the rate of nutrient supply to the tip would be sufficient to allow the hyphae to extend 3.5 mm over the same period. In the future, this transport submodel could be incorporated into the model of mycelial growth developed in the first part of the work, thereby producing a model that describes how the translocation of nutrients within aerial hyphae affects their spatial distribution.

Keywords: Filamentous fungi. Mathematical modeling. Cellular automata. N-tanks-in-series. Nutrient translocation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 2.1	– O CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS SOBRE SUPERFÍCIES E ALGUNS DOS FENÔMENOS ENVOLVIDOS EM NÍVEL MICROSCÓPICO	19
FIGURA 2.2	– MECANISMOS DE CRESCIMENTO FÚNGICO A PARTIR DE UM ESPORO	21
FIGURA 2.3	– DIAGRAMA ESQUEMÁTICO REPRESENTANDO UMA HIFA SEPTADA	24
FIGURA 2.4	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CULTIVO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	32
FIGURA 2.5	– DESENHO ESQUEMÁTICO DO CRESCIMENTO DE HIFAS EM UMA SUPERFÍCIE DE CONTROLE, EM DOIS TEMPOS DISTINTOS	35
FIGURA 2.6	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO DE DAVIDSON E ÖLSSON (2000)	38
FIGURA 2.7	– DISTRIBUIÇÃO DE ^{14}C EM PLACAS INOCULADAS COM <i>Arthrobotrys superba</i> SOBRE UM PEDAÇO DE MADEIRA ISOLADA E CRESCENDO SOBRE SOLO TRATADO COM O CALOR	40
FIGURA 2.8	– DESENHO ESQUEMÁTICO DO SISTEMA MODELADO POR NOPHARATANA, HOWES E MITCHELL (1998)	42
FIGURA 2.9	– PERFIS SIMULADOS E EXPERIMENTAIS DO CRESCIMENTO DE HIFAS AÉREAS	45
FIGURA 2.10	– DESENHOS ESQUEMÁTICOS DOS SISTEMAS DE MODELAGEM FÚNGICA	47
FIGURA 4.1	– CORTE TRANSVERSAL EM UMA PARTÍCULA ONDE OCORRE CRESCIMENTO E O ESPAÇO VIRTUAL DO MODELO	61
FIGURA 4.2	– EXEMPLO DE COMO A REDE DO MICÉLIO É ORIGINADA A PARTIR DE UM ESPORO	62
FIGURA 4.3	– EXTENSÃO DE UMA HIFA EM (a) 1D, (b) 2D OU (c) 3D	64
FIGURA 4.4	– MODOS DE BLOQUEIO RELACIONADOS À LOCALIZAÇÃO DA HIFA-MÃE	68
FIGURA 4.5	– POSSIBILIDADES DE RAMIFICAÇÃO NO PADRÃO R	70
FIGURA 4.6	– FLUXOGRAMA REPRESENTATIVO DOS EVENTOS E DAS DECISÕES DO MODELO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS	77
FIGURA 4.7	– AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) PARA O CRESCIMENTO	

	DA BIOMASSA AÉREA DO FUNGO <i>Rhizopus oligosporus</i> SOBRE PDA.....	81
FIGURA 4.8	– AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) PARA O CRESCIMENTO DA BIOMASSA AÉREA COM APENAS UM TIPO DE BIOMASSA.....	84
FIGURA 4.9	– AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) VARIANDO O PARÂMETRO mov_{npmax}	87
FIGURA 4.10	– AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) VARIANDO O PARÂMETRO α	89
FIGURA 4.11	– AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) VARIANDO $P_{V \rightarrow R}$	91
FIGURA 4.12	– AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) VARIANDO G	93
FIGURA 5.1	– DESENHO ESQUEMÁTICO DE UMA HIFA MODELADA COMO UM CONJUNTO DE TANQUES EM SÉRIE.....	106
FIGURA 5.2	– COMPRIMENTO DE UMA ÚNICA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	115
FIGURA 5.3	– CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA VÁRIOS COMPRIMENTOS DE HIFA.....	116
FIGURA 5.4	– CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA PARA VÁRIOS TEMPOS.....	117
FIGURA 5.5	– COMPRIMENTO DE UMA ÚNICA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUXO CONVECTIVO.....	119
FIGURA 5.6	– CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NO TANQUE DA PONTA DA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIFERENTES VALORES DE FLUXO CONVECTIVO.....	120
FIGURA 5.7	– CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NO TANQUE DA PONTA DA HIFA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA ATÉ 40 h PARA TRÊS DIFERENTES VALORES DE FLUXO CONVECTIVO.....	120
FIGURA 5.8	– COMPRIMENTO DE UMA ÚNICA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIFERENTES VALORES DE k_1	122
FIGURA 5.9	– CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NO TANQUE DA PONTA DA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIFERENTES VALORES DE k_1	123
FIGURA 5.10	– CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NO TANQUE DA PONTA DA HIFA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA ATÉ 40 h PARA TRÊS DIFERENTES VALORES DE k_1	123

FIGURA 5.11 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS REGIÕES ONDE OCORREM TRANSFERÊNCIA DE MASSA E CINÉTICA DE CRESCIMENTO NO MODELO DE LÓPEZ-ISUNZA, LARRALDE-CORONA E VINIEGRA-GONZÁLEZ (1997).....	126
--	-----

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1	– PARÂMETROS FIXOS DO MODELO DOS AUTÔMATOS CELULARES	79
TABELA 4.2	– PARÂMETROS VARIÁVEIS DO MODELO DOS AUTÔMATOS CELULARES E SEUS VALORES ESTIMADOS.....	79
TABELA 5.1	– PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A RESOLUÇÃO DO MODELO DOS TANQUES EM SÉRIE	114

LISTA DE SIGLAS

- CA – Autômatos Celulares (*Cellular Automata*)
- EDO – Equação Diferencial Ordinária
- EDP – Equação Diferencial Parcial
- FES – Fermentação em Estado Sólido
- FRAP – Recuperação de Fluorescência após Fotodegradação (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*)
- HGU – Unidade de Crescimento da Hifa (*Hyphal Growth Unit*)
- PDA – Meio de Cultivo *Potato Dextrose Agar*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 O CRESCIMENTO DE FUNGOS SOBRE SUPERFÍCIES E OS FENÔMENOS ENVOLVIDOS.....	18
2.1.1 Mecanismos de Crescimento Fúngico.....	21
2.1.1.1 Germinação do Esporo.....	22
2.1.1.2 Crescimento da Hifa	23
2.1.1.3 Ramificação.....	25
2.1.1.4 Diferenciação.....	26
2.1.1.5 Absorção e Translocação de Nutrientes.....	27
2.2 A IMPORTÂNCIA DAS HIFAS AÉREAS.....	30
2.3 A MODELAGEM MATEMÁTICA APLICADA AO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	32
2.3.1 Modelos Contínuos	34
2.3.2 Modelos Discretos.....	47
2.3.2.1 Modelos Discretos <i>Lattice-based</i>	48
2.3.2.2 Modelos Discretos <i>Lattice-free</i>	50
2.3.3 Modelos Híbridos Contínuo-Discretos.....	52
2.3.4 Comparação entre Modelos Contínuos e Modelos Discretos.....	55
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	57
4 MODELAGEM DO MICÉLIO FÚNGICO POR MEIO DE AUTÔMATOS CELULARES.....	59
4.1 DESCRIÇÃO DO SISTEMA.....	60
4.1.1 Características Gerais do Sistema	61
4.1.2 Escolha de Direções e Alongamento sem Restrições.....	63
4.1.3 Ramificação.....	66
4.1.3.1 Padrão V de Ramificação.....	67
4.1.3.2 Padrão R de Ramificação.....	69
4.1.4 Diferenciação	70
4.1.5 Germinação.....	71
4.1.6 Movimentos não Permitidos	72

4.1.7 Outras Suposições do Modelo	73
4.1.8 Calibração do Modelo e Determinação de Parâmetros	74
4.2 RESULTADOS	80
4.2.1 Ajuste do Modelo aos Dados Experimentais	80
4.2.2 Análise de Sensibilidade	83
4.2.2.1 Biomassa Vegetativa x Biomassa Reprodutiva	83
4.2.2.2 Influência de mov_{npmax}^V	86
4.2.2.3 Influência do Parâmetro α	88
4.2.2.4 Influência do Parâmetro $P_{V \rightarrow R}$	90
4.2.2.5 Influência de G	92
4.3 DISCUSSÃO	94
4.3.1 Regras que mais influenciam o sistema	94
4.3.2 Sistemas de Modelagem Semelhantes	95
4.3.3 O Modelo no Contexto da FES	99
4.3.4 Possíveis Modificações e Extensões do Modelo	101
5 MODELAGEM DE UMA ÚNICA HIFA ATRAVÉS DE TANQUES EM SÉRIE	104
5.1 DESCRIÇÃO GERAL DO SISTEMA	105
5.1.1 Reação de Formação de Biomassa	110
5.1.2 Condições Iniciais	111
5.1.3 Outras Suposições do Modelo	112
5.1.4 Estimação de Parâmetros e Calibração do Modelo	113
5.2 RESULTADOS	115
5.3 DISCUSSÃO	125
5.3.1 Desenvolvimento de uma Única Hifa	125
5.3.2 Desenvolvimento fúngico a partir de uma fonte de nutrientes isolada	128
5.3.3 Mecanismos de Transporte	130
5.3.4 Possíveis Modificações e Extensões do Modelo e Sugestões para Trabalhos Futuros	132
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
REFERÊNCIAS	137

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos microscópicos que chamam atenção pela vasta gama de ambientes em que aparecem, desde o solo até o corpo humano. Eles desempenham um papel central como decompositores da matéria orgânica, participando da ciclagem global do carbono. Através de conexões simbióticas com o sistema radicular de plantas, auxiliam na transferência e distribuição de nutrientes e minerais.

Além do seu papel ecológico, os fungos são microrganismos de interesse industrial presentes na produção de alimentos, fármacos, intermediários químicos, enzimas e materiais agroindustriais (NIELSEN, 1996). Desde o desenvolvimento de processos industriais para a produção de penicilina, após a Segunda Guerra Mundial, os fungos filamentosos têm desempenhado um papel importante na produção de vários metabólitos de valor, incluindo antibióticos e enzimas, em processos de fermentação submersa. Mais recentemente, desde aproximadamente 1980, aplicações que envolvem o crescimento de fungos filamentosos em superfícies de matérias orgânicas úmidas e em contato com o ar têm ganhado atenção. Tais sistemas incluem a biofiltração e a fermentação em estado sólido (FES). Embora os processos de FES para a produção de alimentos fermentados já existam há séculos, somente por volta de 1980 foi que surgiram, primeiro, um grande interesse no desenvolvimento de novos produtos e, segundo, um grande interesse em estudos para entender o processo quantitativamente. O presente trabalho trata de uma tentativa de aprofundar o conhecimento sobre os fenômenos que controlam o crescimento, no nível microscópico, de fungos filamentosos nestes sistemas. Especificamente, enfoca o crescimento de hifas aéreas.

Hifa é a unidade física microscópica formada em microrganismos filamentosos devido à conexão de células vegetativas. É uma estrutura cilíndrica com raio entre 1 e 10 μm (TINDEMANS; KERN; MULDER, 2006). Ela emerge do crescimento de um único esporo. Após a germinação, o esporo dá origem a um “tubo” que estende seu comprimento através de crescimento na ponta (NIELSEN, 1996) e, ao mesmo tempo, forma ramificações, constituindo novas hifas. O conjunto de “tubos” entrelaçados forma uma rede conhecida por micélio.

No caso particular de crescimento sobre uma superfície úmida e nutritiva em contato com o ar, essas hifas podem se estender para longe da superfície (predominantemente de forma perpendicular à superfície), colonizando o espaço aéreo, através das chamadas hifas aéreas. As hifas podem também penetrar para dentro da matriz da partícula sólida, através das hifas penetrantes. Essa morfologia única permite que os fungos explorem superfícies, chegando em regiões ricas em nutrientes, fenômeno de grande importância nos processos citados anteriormente.

Dentro da estrutura física dessas hifas, existe um conjunto de processos fisiológicos que contribuem para a absorção, armazenamento e distribuição de nutrientes através da rede de hifas, de uma maneira aparentemente bem coordenada (CAIRNEY, 2005). Em nível microscópico, acredita-se que o transporte de nutrientes em hifas individuais é mediado por uma combinação de difusão, fluxo de massa devido a correntes citoplasmáticas generalizadas e transporte vesicular específico (CAIRNEY, 2005). Apesar da importância desses processos, pouco se sabe sobre a anatomia celular e subcelular dos caminhos, sobre o mecanismo de transporte e suas forças motoras e sobre a natureza da informação biológica que deve ser transmitida no interior da hifa para que ocorram respostas globais coordenadas em função de estímulos nutricionais locais. Isso ocorre porque a translocação de nutrientes envolve processos que ocorrem em uma vasta gama de escalas, desde a absorção de nutrientes por transportadores em hifas individuais até a translocação através de redes que podem se espalhar por muitos metros (FRICKER *et al.*, 2008). Além disso, há pouca investigação de como esses fenômenos contribuem para a distribuição espacial das hifas no sistema de interesse e, portanto, um melhor entendimento se faz necessário.

Neste contexto, a modelagem matemática pode desempenhar um papel chave na análise descritiva e preditiva, uma vez que é uma ferramenta poderosa e eficiente de descrição que possibilita uma visão profunda das interações complexas entre sistemas biológicos e o ambiente (DAVIDSON, 2007). No caso específico destacado até aqui, do crescimento de fungos filamentosos sobre superfícies úmidas e nutritivas em contato com o ar, um modelo matemático que reúna e integre os fenômenos físicos e biológicos envolvidos pode ser uma ferramenta poderosa para esclarecer como eles interagem para controlar a cinética de crescimento e a distribuição espacial das hifas quando um fungo é cultivado nesse sistema.

Neste contexto, o foco deste trabalho é a modelagem do crescimento e da distribuição do micélio fúngico no espaço aéreo acima de superfícies úmidas e nutritivas. Busca-se, com isso, compreender como os fenômenos interagem para controlar a distribuição das hifas aéreas em função da altura no sistema de interesse. O trabalho visa também estudar o desenvolvimento de uma única hifa e investigar matematicamente como o transporte de nutrientes no interior dela pode influenciar em seu crescimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta seção apresenta três partes: primeiramente, uma introdução sobre como ocorre o crescimento de fungos filamentosos sobre superfícies e o estado atual de conhecimento sobre os fenômenos envolvidos; em seguida, a importância do crescimento aéreo; e por fim, uma revisão das diferentes abordagens que já foram utilizadas para a modelagem matemática do crescimento de fungos filamentosos no sistema de interesse.

2.1 O CRESCIMENTO DE FUNGOS SOBRE SUPERFÍCIES E OS FENÔMENOS ENVOLVIDOS

Os fungos filamentosos são organismos capazes de crescer em diversos ambientes. Na decomposição natural de matérias orgânicas úmidas, em sistemas de biofiltração e de fermentação no estado sólido, por exemplo, tem-se o caso específico de crescimento destes fungos sobre superfícies úmidas e nutritivas em contato com o ar. Em todos esses exemplos, o crescimento dos fungos envolve diferentes micro-ambientes de crescimento, os quais são exemplificados na Figura 2.1.

De acordo com a Figura 2.1, há possibilidade de o fungo crescer tanto no sentido horizontal, espalhando sobre a superfície as chamadas hifas superficiais na camada circundada por água, quanto no sentido vertical, para cima ou para baixo. As hifas que crescem no interior da matriz do substrato, circundadas pelo substrato por todos os lados, em geral alcançando profundidades cada vez maiores, são as chamadas hifas penetrantes. As hifas que crescem no espaço aéreo, com abundância de ar ao redor, geralmente alcançando alturas, no sentido vertical, cada vez maiores, são as chamadas hifas aéreas. À rede formada pelo emaranhado de hifas dá-se o nome de micélio. Assim, de maneira análoga, podem ser definidos o micélio superficial, o aéreo e o penetrante.

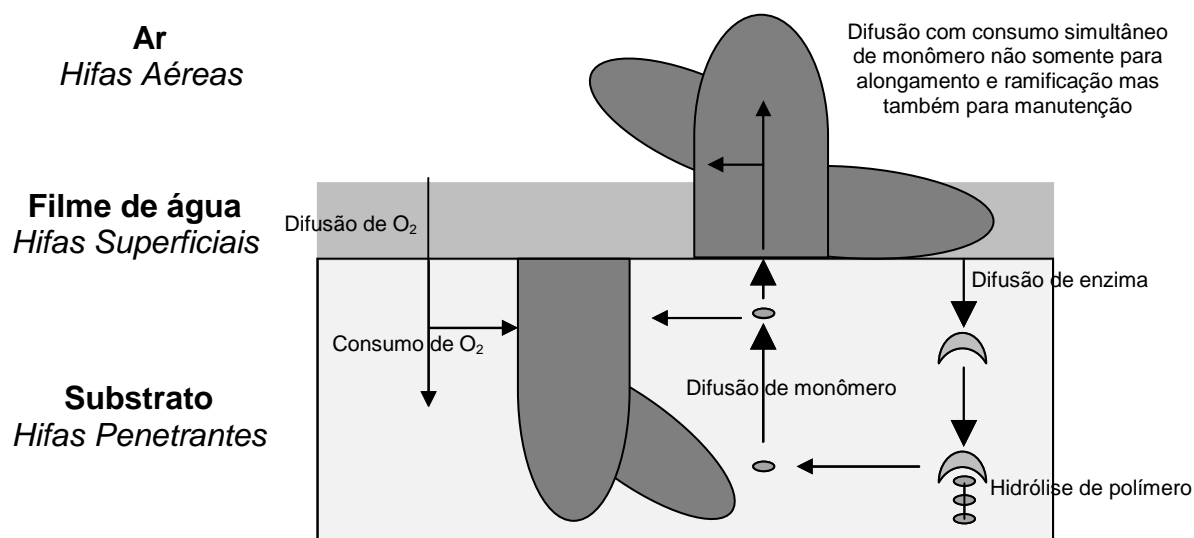


FIGURA 2.1 – O CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS SOBRE SUPERFÍCIES E ALGUNS DOS FENÔMENOS ENVOLVIDOS EM NÍVEL MICROSCÓPICO

Os diferentes tipos de biomassa (aérea, superficial ou penetrante) consomem nutrientes e secretam metabólitos e enzimas. No meio extracelular, dentro da matriz do meio sobre o qual os fungos crescem, o transporte de nutrientes e produtos fica limitado à difusão, ocasionando a formação de gradientes, de tal maneira que a concentração de nutrientes pode ser muito baixa no local onde a biomassa está crescendo e os consumindo, o que pode limitar o crescimento. De outro lado, os fungos são microrganismos aeróbios, o que quer dizer que precisam de oxigênio molecular para gerar a energia necessária ao crescimento. Este oxigênio necessário para a respiração da biomassa deve ser capaz de difundir não somente da fase gasosa para as hifas aéreas, mas também para dentro da fase líquida do meio de crescimento até os locais onde ele é consumido pelas hifas que não se encontram em contato direto com o ar.

Para que o crescimento do fungo tenha início, é necessário que ocorra o depósito de esporos sobre a superfície, processo conhecido como inoculação. Depois da deposição, pode ocorrer ou não a germinação, dependendo das condições de temperatura, atividade de água e disponibilidade de nutrientes. Caso ocorra a germinação, primeiro ocorre o desenvolvimento de uma estrutura especializada conhecida como tubo de germinação e, a partir dele, surgem as hifas. Elas iniciam o alongamento através das pontas, ao mesmo tempo em que formam novas pontas, no processo chamado de ramificação. Esses micélios que se

ramificam e estendem, mas não estão diretamente envolvidos com a reprodução, chamam-se micélios (ou hifas) vegetativos.

Em alguns tipos de superfícies, como, por exemplo, as superfícies sólidas de partículas nutritivas compostas de matéria orgânica, a fonte de carbono é frequentemente polimérica. Assim, enzimas precisam ser liberadas para ocorra a hidrólise desses polímeros em monômeros. No caso de crescimento de fungos filamentosos sobre superfícies sólidas, por exemplo, uma possibilidade é de o polímero ser o amido, e o monômero, a glucose. Então, conforme a Figura 2.1, as enzimas amilolíticas liberadas devem difundir pelo substrato e a glucose, que é liberada quando a enzima se encontra com o amido, também precisa difundir até às hifas, superficiais ou penetrantes, antes que possa ser consumida. O oxigênio necessário para o crescimento das hifas penetrantes também enfrenta dificuldades de transporte, como a difusão-reação pelo substrato e pelo filme de água que pode estar presente na superfície. Consequentemente, algumas hifas podem ter muito oxigênio disponível para o consumo (como as hifas aéreas), outras menos quantidades e uma proporção significativa das hifas superficiais e penetrantes pode até vir a enfrentar a ausência de oxigênio. Da mesma forma, os nutrientes necessários ao crescimento das hifas aéreas precisam difundir tanto pelo substrato, para chegar à superfície, como pelo interior da hifa, para chegar até às pontas, local onde ocorrem as reações responsáveis pelo alongamento da hifa. Devido ao processo de difusão-consumo, pode ocorrer a formação de gradientes intracelulares ao longo das hifas aéreas.

Concomitantemente aos fenômenos acima descritos, pode haver a formação de hifas aéreas diferenciadas, as quais possuem função na formação e espalhamento dos esporos. A estas hifas especializadas dá-se o nome de hifas reprodutivas.

O grande problema em relação ao entendimento deste sistema é que, embora os fenômenos isolados já estejam bem caracterizados, as interações entre difusão no meio extracelular, reação, transportes intracelulares, alongação e ramificação ainda não estão bem compreendidas de maneira quantitativa. Assim, a modelagem matemática pode ser um instrumento de investigação que ajuda a compreender a interação entre os fenômenos. O estado da arte da modelagem matemática para este sistema será descrito na seção 2.3. Na próxima seção, os

fenômenos envolvidos e os mecanismos de transporte serão revisados em maiores detalhes.

2.1.1 Mecanismos de Crescimento Fúngico

Os mecanismos de crescimento fúngico podem ser divididos em quatro estágios principais (NIELSEN, 1992): germinação do esporo, crescimento da hifa, ramificação e, finalmente, diferenciação fúngica (Figura 2.2). Esses quatro estágios serão discutidos em maiores detalhes nas subseções que seguem.

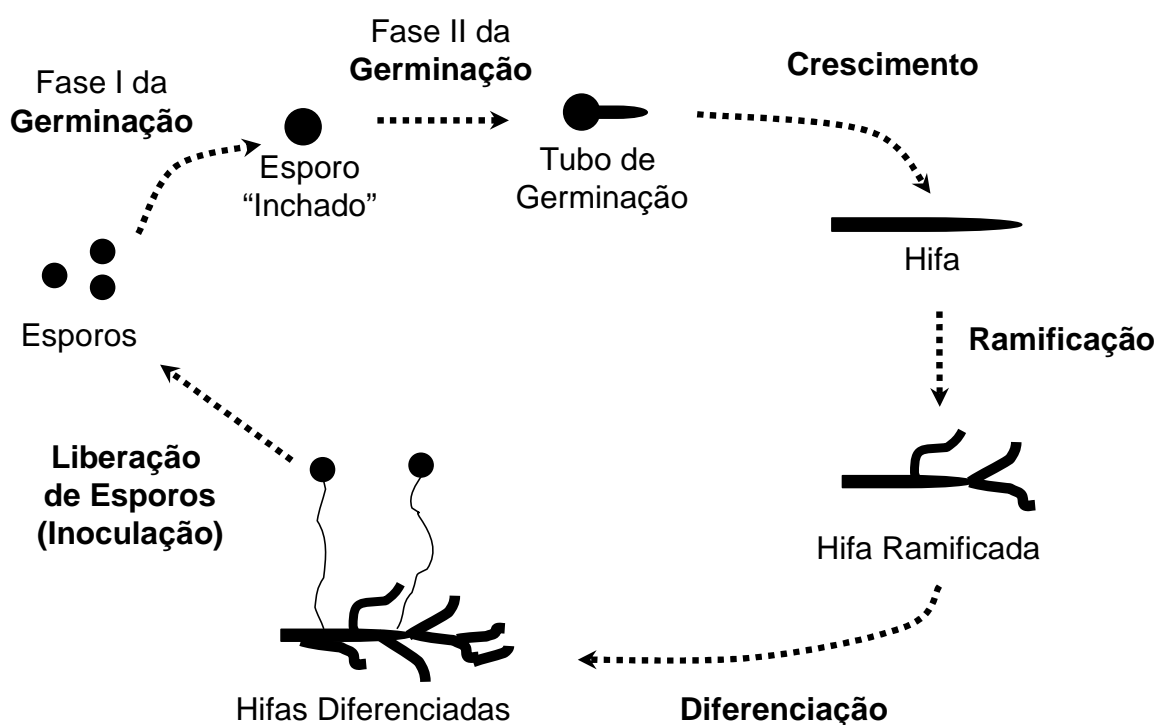


FIGURA 2.2 – MECANISMOS DE CRESCIMENTO FÚNGICO A PARTIR DE UM ESPORO

Após inoculação, o esporo germina e dá origem a um tubo de germinação, que pode se desenvolver em uma hifa crescente. Após atingir certo tamanho, a hifa se ramifica e novas pontas são formadas. Quando o micélio é maduro, estruturas diferenciadas se desenvolvem para a liberação de esporos e reinício do ciclo vital (a figura não está em escala).

2.1.1.1 Germinação do Esporo

Ao se cultivar um fungo, tanto inoculação com pedaços de hifas quanto inoculação com esporos podem ser utilizadas para iniciar o cultivo. Em processos como FES, o uso de esporos é comum, já que são mais fáceis de serem contados e controlados para assegurar a reprodutibilidade do processo.

O processo de germinação depende de fatores como temperatura, pH e atividade de água. Para o fungo *Rhizopus oligosporus* (fungo a ser modelado neste trabalho) são identificadas duas fases distintas durante a germinação: “inchamento” (fase I) e extensão do tubo de germinação (fase II) (MEDWID; GRANT, 1984). Estas fases estão representadas na Figura 2.2. Na fase I, os esporos aumentam de volume por hidratação; então, processos metabólicos têm início, resultando num aumento na taxa de respiração e na síntese de proteínas e ácidos nucleicos a partir das reservas de nutriente do próprio esporo. Nesta fase, os esporos aumentam tanto o diâmetro quanto a quantidade de biomassa (OLIVER; TRINCI, 1985) e é necessária a presença de uma fonte de carbono apropriada (MEDWID; GRANT, 1984). O material que forma a parede do tubo de germinação é produzido e o crescimento do esporo rapidamente torna-se polarizado, resultando na formação de um tubo (tubo de germinação) que estende através do crescimento na ponta. A fase II é iniciada quando este tubo se desenvolve em uma hifa (NIELSEN, 1996), sendo que esta fase requer a presença simultânea de uma fonte de carbono e de uma fonte de nitrogênio no meio externo para sustentar o alongamento, visto que as reservas energéticas do esporo são suficientes para sustentar somente a extensão inicial do tubo germinativo. Este processo de germinação geralmente leva de 3 a 8 h para ser completado, mas este tempo pode ser maior para alguns tipos de esporo.

2.1.1.2 Crescimento da Hifa

A hifa é a estrutura física de crescimento dos fungos. É uma estrutura cilíndrica com raio entre 1 e 10 μm , microscópica e formada devido à conexão de células vegetativas (TINDEMANS; KERN; MULDER, 2006).

As hifas vegetativas, ou seja, aquelas não envolvidas na produção de estruturas reprodutivas, somente crescem nas pontas. Nas estruturas aéreas que são envolvidas na reprodução, conhecidas como esporangióforos, pode ocorrer tanto o crescimento nas pontas quanto crescimento intercalar, no qual material é incorporado em regiões subapicais (PROSSER; TOUGH, 1991).

Para o crescimento apical das hifas superficiais, o material sintetizado em regiões distais delas é transportado para a ponta e incorporado na parede, de tal maneira que a ponta se move para frente sobre o meio. O crescimento intercalar sobre o meio sólido necessitaria que as regiões à frente do local de crescimento fossem empurradas para frente. Isto seria ineficiente, uma vez que a hifa necessitaria vencer forças friccionais, além de ter a necessidade de manter a rigidez da parede para evitar quebras. As hifas aéreas, por outro lado, como não estão sujeitas às forças friccionais, podem crescer eficientemente por crescimento intercalar (PROSSER; TOUGH, 1991). Este crescimento intercalar, porém, é pouco explorado e a maioria dos autores, ao descrever o crescimento fúngico, relata que a hifa é uma estrutura que alonga na ponta.

A área ao longo de uma hifa fúngica vegetativa pode ser dividida em três compartimentos principais: o compartimento apical; o compartimento subapical e a área atrás do compartimento subapical (TRINCI, 1971), conforme mostrado na Figura 2.3. O termo “compartimento apical” se refere à área entre a ponta e o primeiro septo, para hifas septadas. Em hifas não-septadas, o compartimento apical é reconhecido por ter uma parede mais fina, ausência de mitocôndrias e núcleo e uma alta concentração de vesículas. A área atrás do compartimento apical, a qual contém septos abertos em hifas septadas, é o compartimento subapical. A troca de material entre o compartimento apical e o subapical ocorre porque os septos são perfurados. Como o material pode fluir entre o compartimento apical e o subapical, essas duas regiões contribuem para a extensão da ponta e, juntos, estes dois compartimentos recebem o nome “zona de extensão apical” (TRINCI, 1971).

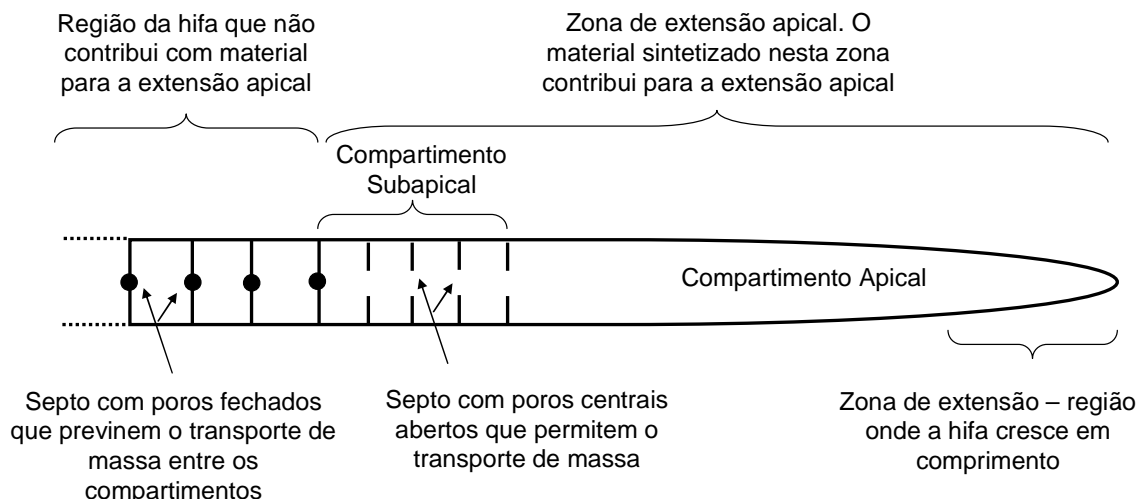


FIGURA 2.3 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO REPRESENTANDO UMA HIFA SEPTADA

O diagrama não está em escala. Adaptado de Trinci (1971).

A adição de material na parede ocorre principalmente na zona de extensão apical. Durante o crescimento normal e irrestrito da hifa, a parte da hifa que representa a zona de extensão é constante em diâmetro, comprimento e forma, e difere de regiões subapicais por ter uma parede mais fina e de maior suscetibilidade à lise por choque osmótico ou mudanças na atividade enzimática. Esta parte da hifa contém uma grande concentração de vesículas ligadas à membrana e microvesículas que contém ou consistem de glicoproteínas ou enzimas necessárias para a síntese da parede. O conteúdo das vesículas é liberado para a formação da parede, enquanto a membrana da vesícula contribui para a expansão da membrana plasmática ao se fundir com ela. Os núcleos e mitocôndrias responsáveis pela extensão estão localizados no compartimento subapical, junto com organelas como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, organelas estas que representam o local onde ocorre a formação de vesículas (PROSSER; TOUGH, 1991).

A ponta, então, é o local destinado para a incorporação de um grande número de vesículas, e consequente alongamento da parede e da hifa. As regiões subapicais funcionam para sintetizar e empacotar o material necessário para a extensão e para o transporte deste material em vesículas até às pontas. O comprimento da hifa capaz de contribuir para o crescimento da ponta depende da eficiência destes mecanismos de transporte. Assim, a velocidade de extensão da hifa depende da velocidade de dois processos. Primeiro, depende da velocidade de fornecimento de material à zona de extensão, que é governada pela velocidade de

síntese de precursores de parede em regiões distais. Segundo, depende da velocidade de incorporação da matéria na ponta, que é governada pelo tamanho da zona de extensão e, portanto, pelo seu diâmetro e comprimento (PROSSER; TOUGH, 1991).

2.1.1.3 Ramificação

Novas pontas de hifas fúngicas são produzidas a partir de uma hifa no processo conhecido por ramificação. A ramificação das hifas tem dois propósitos gerais: primeiro, ela aumenta a área superficial da colônia, o que presumivelmente aumenta a probabilidade de encontrar e assimilar nutrientes; segundo, as ramificações medeiam eventos de fusão nas hifas, os quais são importantes para a troca de nutrientes e transmissão de sinais entre diferentes hifas de uma mesma colônia. Entretanto, pouco se sabe sobre as bases moleculares da ramificação fúngica (HARRIS, 2008).

O crescimento exponencial de biomassa observado na expansão de microcolônias de fungos não seria possível se apenas o tubo de germinação estendesse a uma velocidade constante sem um aumento significativo no diâmetro. O aumento no diâmetro normalmente não ocorre. Além disso, o citoplasma sintetizado em regiões distais que é incapaz de atingir o ápice da hifa deve ser acomodado de alguma maneira. Ambos os casos são convenientemente resolvidos pela formação de ramificações (PROSSER; TOUGH, 1991).

Conforme as vesículas são produzidas no compartimento subapical e transportadas para as pontas, pode ocorrer o acúmulo de vesículas em hifas septadas atrás dos septos parcialmente fechados. Como resultado, as ramificações ocorrem principalmente no compartimento subapical, dando origem às chamadas ramificações laterais. Entretanto, ramificação pode também ocorrer no compartimento apical quando o fluxo de vesículas para as pontas é maior do que a taxa de fusão destas na parede celular das pontas (NIELSEN, 1992), dando origem às chamadas ramificações apicais (este processo de ramificação apical é também conhecido como ramificação dicotômica). A ramificação apical é bem caracterizada em diversos fungos, como *Aspergillus niger* (REYNAGA-PEÑA; GIERZ; BARTNICKI-

GARCIA, 1997) e *Neurospora crassa* (RIQUELME; BARTNICKI-GARCIA, 2004). Os mecanismos que controlam o aparecimento de um ou de outro tipo de ramificação são diferentes (WATTERS; GRIFFITHS, 2001) e ainda pouco se sabe sobre como um local de ramificação é selecionado (HARRIS, 2008).

O crescimento das pontas e a ramificação podem ser caracterizados pela unidade de crescimento da hifa (*hyphal growth unit* - HGU) (TRINCI, 1974). Este valor representa o comprimento de hifa requerido para o crescimento entre uma ramificação e outra e é definido como a razão entre o comprimento total do micélio e o número de ramificações. O valor permanece constante após uma oscilação inicial para uma dada espécie se o diâmetro da hifa é constante durante o crescimento (TRINCI, 1974).

2.1.1.4 Diferenciação

A diferenciação refere-se ao processo de mudança regulada de um organismo de um estado fisiológico-morfológico para outro. Em geral, se descreve a diferenciação como relacionada à mudança das hifas vegetativas para hifas especializadas na reprodução, mas outros tipos de diferenciação também ocorrem, como será descrito a seguir.

Em colônias jovens, as hifas possuem aproximadamente a mesma velocidade de extensão, comprimento da zona de extensão e diâmetro. Em hifas vegetativas de colônias maduras, entretanto, existe uma hierarquia tal que a hifa parental se estende mais rapidamente, possui uma zona de extensão maior e também um diâmetro maior. O ângulo de ramificação diminui e a hifa se torna orientada para da margem da colônia (STEELE; TRINCI, 1975). Essas mudanças que ocorrem no processo de diferenciação estão relacionadas à produção de metabólitos secundários que difundem para a margem da colônia, sinalizando um aumento do diâmetro da hifa que sustentará a maior velocidade de extensão. Estes compostos também parecem provocar o autotropismo negativo que faz com que as hifas cresçam para longe do centro da colônia (para as margens) e sejam menos ramificadas (PROSSER; TOUGH, 1991).

A expansão da colônia é então acompanhada por outros processos de diferenciação. Conforme as condições no centro da colônia se tornam menos favoráveis para o crescimento, a formação de estruturas aéreas reprodutivas é iniciada. Estas estruturas fazem com que os esporos sejam liberados de alturas maiores, o que permite a colonização de uma área maior. Uma colônia madura consiste, assim, de um anel externo de hifas vegetativas que se orientaram para a margem; e de uma região central de hifas vegetativas maduras, com condições menos favoráveis, que se diferenciaram para produzir estruturas aéreas reprodutivas de esporulação e reiniciar o ciclo vital (PROSSER; TOUGH, 1991).

2.1.1.5 Absorção e Translocação de Nutrientes

Os fungos necessitam de fontes de nutrientes para lhes fornecer energia para manutenção celular e biossíntese e também fornecer a matéria-prima para a construção das células. O sucesso dos fungos como organismos heterotróficos reside não somente na habilidade de invadir substratos, mas também na habilidade de quebrar o material insolúvel em componentes solúveis necessários para a dieta deles (JENNINGS, 1995). Essa habilidade está relacionada à capacidade dos fungos de secretar enzimas hidrolíticas que “quebram” fontes de nutrientes poliméricas, como celulose ou amido, em pequenas moléculas, como monossacarídeos ou dissacarídeos. São essas pequenas moléculas que os fungos podem absorver através da parede celular e da membrana da célula.

A membrana celular fúngica é uma membrana semipermeável que regula a absorção de nutrientes do meio extracelular para o citoplasma e permite a liberação de substâncias na outra direção (GRIFFIN, 1996). Os nutrientes devem passar através da membrana para dentro da célula antes de serem utilizados. O mecanismo de transporte relacionado à absorção pode ser tanto transporte passivo, no qual o transporte depende do gradiente de concentração e é a favor dele, ou transporte ativo, o qual envolve um gasto de energia tal que é possível o acúmulo da substância de interesse no citoplasma da célula (GRIFFIN, 1996) mesmo contra o gradiente de concentração.

Independente do mecanismo de transporte, a maioria das substâncias se move através da membrana celular por meio de carregadores específicos. A velocidade de absorção de nutrientes por meio desses carregadores pode ser geralmente explicada pela equação de Michaelis-Menten. Nesta equação, em baixas concentrações de nutrientes, a velocidade de absorção cresce rapidamente conforme a concentração de nutrientes aumenta. Em altas concentrações de nutrientes, um aumento na concentração de nutriente tem pouco efeito na velocidade de absorção (GRIFFIN, 1996).

Uma vez que um nutriente é absorvido, seu movimento do local de absorção até outra parte da hifa é chamado de translocação (JENNINGS, 1995). Em hifas individuais, acredita-se que a translocação de nutrientes seja mediada por uma combinação de fluxo de massa, difusão e transporte vesicular específico (CAIRNEY, 2005). Para o caso do fluxo de massa, acredita-se que a força motriz seja fornecida (a) pela geração de um gradiente osmótico que dirige a entrada de água e então gera uma pressão hidrostática dentro da hifa ou entre a hifa e a fonte ou (b) pela evaporação de água em uma dada região da hifa, o que ocasionaria ao nutriente se mover dentro da mesma devido a diferenças de pressão hidrostática (JENNINGS, 1995). Ainda, acredita-se que em alguns fungos existem sistemas contráteis que transportam os nutrientes em “pacotes” dentro das hifas (JENNINGS, 1995), o que foi anteriormente descrito como transporte vesicular específico.

Segundo Cairney (2005), os mecanismos de transporte podem operar simultaneamente, e a translocação pode ser dirigida por diferentes mecanismos em fungos diferentes. Dentro de uma mesma espécie fúngica os mecanismos também podem variar, dependendo das condições ambientais.

Na maioria dos modelos que serão revisados adiante, pressupõe-se que a difusão é o principal mecanismo de transporte de nutrientes ao longo da hifa. O papel dominante da difusão como mecanismo de transporte em três fungos diferentes foi estabelecido por Olsson e Jennings (1991). Este papel dominante, entretanto, foi estabelecido em experimentos em colônia, no qual o nutriente estudado deveria ser transportado da fonte na margem da colônia para o centro dela, enquanto a expansão da colônia e o fluxo de citoplasma se dava do centro para as margens.

Davidson e Olsson (2000) modelaram dados, obtidos por Persson, Olsson e Jansson (2000), da distribuição de um marcador radioativo em função da distância

do crescimento de um fungo a partir de uma fonte de nutrientes isolada (crescimento e transporte de nutrientes no mesmo sentido). Ao incluir apenas a difusão como mecanismo de transporte, o modelo explicava os dados experimentais de crescimento do fungo até uma distância de aproximadamente 10 mm da fonte de nutrientes, que era também o local de inoculação. Para distâncias maiores do que 10 mm, entretanto, a inclusão de um fluxo convectivo para o transporte fez-se necessária para explicar os dados experimentais, o que demonstrou a importância que o fluxo convectivo pode exercer sobre o transporte de nutrientes.

Dados de velocidade de translocação de nutrientes para fungos do grupo dos basidiomicetos estão amplamente difundidos na literatura e variam em várias ordens de magnitude, de $5 \times 10^{-2} \mu\text{m s}^{-1}$ a $1 \times 10^3 \mu\text{m s}^{-1}$ (CAIRNEY, 2005). A difusão por si só não seria um mecanismo eficiente para explicar as maiores velocidades de translocação obtidas e, por isso, conclui-se que outros mecanismos de transporte estão presentes.

O mecanismo de transporte envolvido no crescimento das hifas aéreas ainda não foi estudado. O sistema seria semelhante ao modelado por Davidson e Olsson (2000) (este sistema será revisado na seção 2.3.1), mas com as hifas crescendo para longe do substrato em alturas cada vez maiores. Rahardjo, Tramper e Rinzema (2006) sugerem que para as hifas aéreas, diferentemente das hifas que crescem em colônia e transportam os nutrientes das margens para o centro, contra o fluxo citoplasmático, o alongamento deve envolver concomitante transporte de citoplasma e glucose. A difusão da glucose, então, poderia ser insignificante se comparada à quantidade transportada pelo fluxo citoplasmático. Esses mecanismos de transporte envolvidos no crescimento das hifas aéreas, entretanto, ainda requerem investigação experimental.

2.2 A IMPORTÂNCIA DAS HIFAS AÉREAS

As hifas que se estendem acima da superfície, a uma distância suficiente para manter contato com a fase gasosa, são as chamadas hifas aéreas. Tanto o micélio vegetativo quanto o reprodutivo podem contribuir para a formação de hifas aéreas.

No caso das hifas vegetativas, essa habilidade de crescerem “para longe” do substrato permite que elas cruzem uma fase gasosa para alcançar novos sítios para crescimento. Esse tipo de comportamento é evidente em fungos que produzem uma grande quantidade de micélio em ágar, como nos zigomicetos dos gêneros *Rhizopus* e *Absidia* (CARLILE, 1995).

O caso do crescimento aéreo de hifas reprodutivas é evidente em fungos que crescem em colônia (expansão radial em um plano). Ele acontece porque, conforme ocorre o crescimento radial, os recursos no centro da colônia são exauridos, o crescimento vegetativo limita-se à zona periférica e o crescimento vegetativo no centro da colônia decai. O decaimento da colônia fornece os nutrientes necessários para o crescimento aéreo, onde ramificações crescem “para fora” do micélio vegetativo na superfície. Neste estágio, antibióticos são produzidos para evitar que outros microrganismos utilizem o micélio em decaimento. Finalmente, hifas aéreas começam a se diferenciar para se tornarem hifas reprodutivas que produzem esporos (KÁROLYI, 2005). Nesse caso, o crescimento “para longe” do substrato facilita o espalhamento dos esporos, já que os mesmos são liberados em alturas maiores.

Nos processos de biofiltração, as hifas aéreas ganham destaque ao fornecer uma grande área superficial para a absorção de compostos voláteis (KENNES; VEIGA, 2004) e, portanto, o desenvolvimento delas precisa ser otimizado neste sistema. As hifas aéreas são também de grande importância em FES. A colonização uniforme das partículas em um leito de biorreator, por exemplo, depende do crescimento das hifas aéreas nos espaços entre elas (MITCHELL *et al.*, 2004). Este crescimento para dentro dos poros do leito pode levar à formação de uma massa compacta de partículas amarradas com as hifas e pode ocasionar um aumento na perda de carga da corrente de aeração do biorreator.

A massa compacta formada é resultante do “encolhimento” das partículas de substrato devido à evaporação de água e à formação da rede de micélio altamente densa. Essa massa compacta pode quebrar e abrir espaços entre o leito e a parede em um biorreator, ocasionando a formação de caminhos preferenciais para a corrente de ar e consequentes falhas no controle de temperatura através da aeração forçada. A aeração forçada, quando distribuída de maneira homogênea, contribui para a manutenção da temperatura do sistema. Entretanto, se o ar fluir apenas por canais preferenciais, a remoção do calor não será eficiente e haverá a formação de gradientes de temperatura dentro do leito, os quais prejudicam o desenvolvimento fúngico. Isto causa um dilema, já que as hifas aéreas são desejáveis para a produção de biomassa, mas se tornam indesejáveis para o controle do processo durante a FES ao agregar as partículas (SCHUTYSER *et al.*, 2003). Assim, uma agitação descontínua pode ser preferível, já que o crescimento aéreo é permitido até que a agregação de partículas se torne crítica para o controle do processo. Então, o leito é agitado para prevenir a formação de canais.

O aumento da perda de carga aumenta a energia necessária para manter a vazão de ar desejada. Auria *et al.* (1995) estudaram a perda de carga, relacionando-a com o desenvolvimento das hifas aéreas de *Aspergillus niger* entre as partículas de substrato, dentro de um biorreator sem agitação (a agitação, em FES, pode quebrar a estrutura das hifas). Os autores identificaram as seguintes fases: inicialmente há a germinação dos esporos sem uma perda de carga observável; segundo, durante o crescimento vegetativo, há um aumento acentuado desta perda de carga, devido ao crescimento das hifas aéreas que “amarram” as partículas; uma terceira fase está relacionada a um período sem aumento observável da perda de carga e da biomassa fúngica; então, uma quarta fase, fase de esporulação, ocorre com um aumento na perda de carga devido à formação de estruturas reprodutivas; por fim, na quinta fase, os esporos são liberados e a perda de carga diminui devido ao colapso das hifas reprodutivas. Desta maneira, a perda de carga pode ser usada para o monitoramento do crescimento de *Aspergillus niger* em FES.

Ainda no contexto da FES, Rahardjo *et al.* (2005) mostraram que o micélio aéreo é significativo no consumo de oxigênio, produção de biomassa e produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* cultivado sobre farelo de trigo. O fungo produzia duas vezes a quantidade de biomassa e α -amilase quando o micélio aéreo era formado em comparação com um cultivo em que o micélio aéreo foi suprimido.

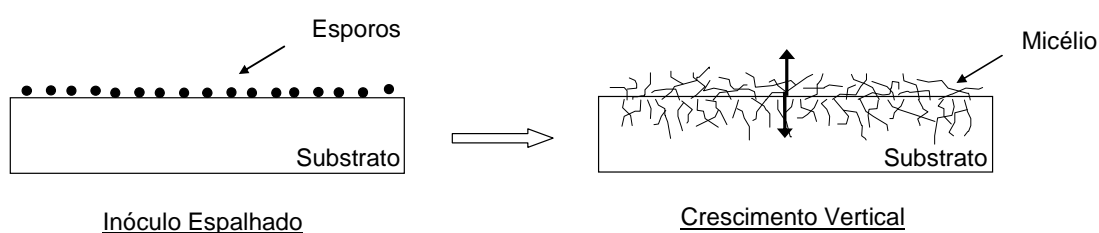
Apesar da importância do micélio aéreo, o papel fisiológico do desenvolvimento do micélio aéreo vegetativo ainda não é claro. Os dados mostrados por Rahardjo *et al.* (2005) sugerem que as hifas aéreas aceleram a produção de enzimas, mas não há provas de que sejam as hifas aéreas que as produzam.

2.3 A MODELAGEM MATEMÁTICA APLICADA AO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Conforme foi descrito nas seções 2.1 e 2.2, muitas questões que envolvem o crescimento de fungos filamentosos sobre superfícies ainda precisam ser esclarecidas. A modelagem matemática aparece como uma ferramenta útil para investigação de como os fenômenos físicos e biológicos interagem para controlar o crescimento de fungos filamentosos no espaço aéreo acima de uma superfície.

Ao longo da revisão que segue, muitas vezes será abordado o tipo de cultivo que foi modelado. Basicamente, modelos para dois tipos de sistema serão descritos: cultivo em colônia e cultivo *overculture*. A diferença entre esses sistemas é mostrada na Figura 2.4.

(a) Crescimento *Overculture*



(b) Crescimento em Colônia

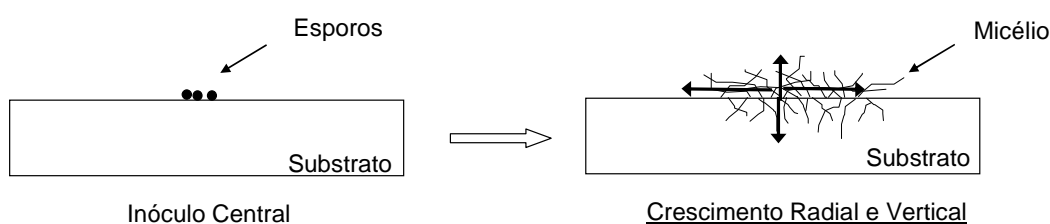


FIGURA 2.4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CULTIVO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O crescimento *overculture* (Figura 2.4a) ocorre quando o fungo é inoculado por toda a superfície de cultivo, e o micélio se desenvolve simultaneamente a partir de muitos pontos, sendo que colônias separadas (chamadas de “microcolônias”) existem somente nos estágios iniciais do processo e logo formam uma massa única. Com toda a superfície coberta, aumentos posteriores na densidade ocorrem pelo crescimento acima e abaixo da superfície. Este tipo de cultivo contrasta com o crescimento em colônia (Figura 2.4b), onde o organismo é inoculado em um ponto, e a colônia se desenvolve a partir deste ponto sobre a superfície, preponderantemente de maneira radial. Em processos como FES o sistema *overculture* é preferido, pois a inoculação com uma alta densidade de células ou esporos permite a rápida colonização da superfície.

Historicamente, duas estratégias diferentes têm sido adotadas para modelar o crescimento do micélio fúngico: modelos contínuos e modelos discretos. Nos modelos contínuos não há divisão explícita da rede modelada, os fungos são representados como uma estrutura contínua e equações diferenciais descrevendo a densidade média da rede do micélio são derivadas. Estes modelos são apropriados para descrever micélios densos. Nos modelos discretos, por outro lado, as hifas individuais são identificadas. Um modelo contínuo é incapaz de gerar redes explícitas de hifas como as que são observadas em ambientes heterogêneos, e, então, uma aproximação discreta pode ser mais adequada neste tipo de ambiente. Nas subseções a seguir, as duas estratégias serão revisadas em maiores detalhes.

2.3.1 Modelos Contínuos

Quando os fungos se desenvolvem em um ambiente rico em nutrientes, há a formação de redes de micélio densas e altamente interconectadas. O micélio resultante pode ser visto, então, como uma distribuição contínua de hifas que estão expandindo e interagindo com o meio sobre o qual elas crescem. Desse modo, equações diferenciais parciais (EDPs) do tipo difusão-reação podem ser propostas para descrever o consumo de substratos e formação de biomassa, sempre tendo em vista que são modeladas as características médias. Por simplicidade, em geral um único nutriente genérico é proposto como a fonte para a sustentação do crescimento fúngico.

O primeiro modelo a utilizar esta estratégia para descrever o processo da difusão de nutrientes, tanto no meio extracelular quanto nas hifas superficiais, foi o modelo proposto por Edelstein (1982), que introduziu as características coletivas do micélio (representação esquemática na Figura 2.5). Em uma sequência de artigos, os autores ligaram o comportamento microscópico de hifas individuais ao comportamento macroscópico da colônia como um todo (EDELSTEIN; SEGEL, 1983; EDELSTEIN *et al.*, 1983). Os autores fizeram um balanço de massa em uma superfície de controle, levando em consideração o alongamento das hifas (Figura 2.5a) e as pontas que entravam e saíam daquele espaço (Figura 2.5b). Os modelos propostos foram do tipo sistemas de EDPs, onde as variáveis dependentes eram a densidade de hifas, a densidade de pontas de hifas e a concentração de um substrato limitante. O substrato existia em duas formas: ou localizado dentro do micélio ou livre no ambiente externo. Essa distinção entre substrato interno e externo permitiu que a translocação fosse explicitamente modelada. As equações do modelo de Edelstein *et al.* (1983) serão revisadas a seguir.

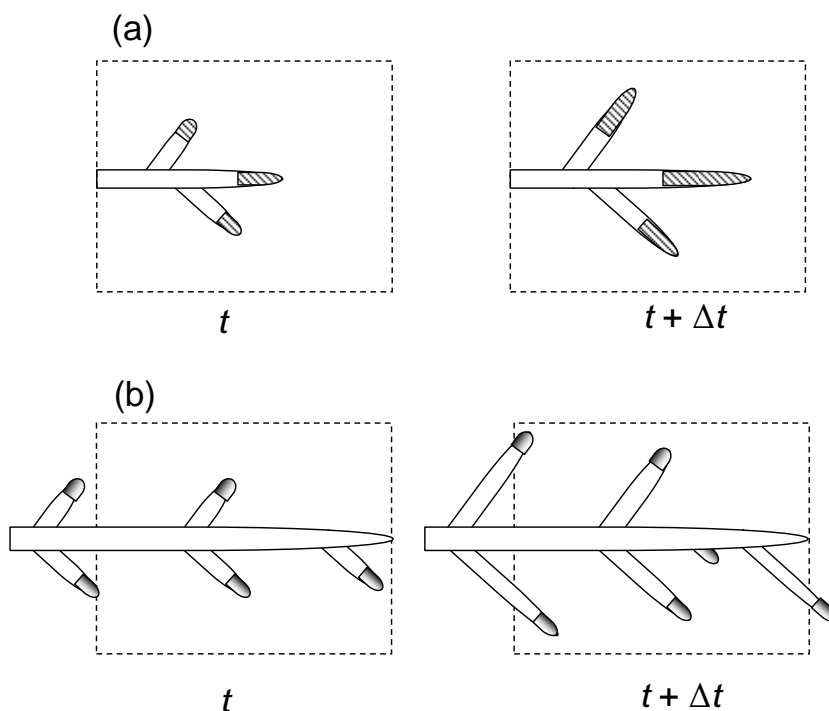


FIGURA 2.5 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO CRESCIMENTO DE HIFAS EM UMA SUPERFÍCIE DE CONTROLE, EM DOIS TEMPOS DISTINTOS

(a) Balanço de massa: como as hifas se estendem somente nas pontas, a taxa de acumulação de novos filamentos depende do número de pontas e da velocidade em que eles alongam. (b) Balanço de pontas: as pontas (no detalhe escuro), devido ao alongamento, são móveis. Então, no balanço, devem ser levadas em consideração as pontas que entram e saem da superfície de controle, bem como a criação de novas pontas caso haja ramificação. O esquema do sistema foi adaptado a partir de Edelstein (1982) e representa também o sistema de Edelstein *et al.* (1983).

O modelo de Edelstein *et al.* (1983) é baseado em propriedades médias do micélio. Como as hifas fúngicas são imóveis e o crescimento ocorria apenas nas pontas, a taxa de acúmulo de hifas dependia do número de pontas em um ponto em particular. Então a variação de densidade de hifas é representada por:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = nv - \gamma_1 \rho \quad (2.1)$$

onde ρ é a densidade de hifas em unidades de comprimento por unidade de área, t é o tempo, n é a densidade de pontas (número de pontas por unidades de área), v é a taxa de extensão da ponta (em unidades de comprimento por ponta por tempo) e γ_1 é a constante que representa a taxa de autólise da hifa. Portanto, o primeiro termo

do lado direito da equação diz respeito à velocidade de formação das hifas e o segundo à velocidade de degradação das mesmas.

Ao assumir que as pontas crescem em uma direção somente, o crescimento das mesmas foi descrito pela equação 2.2:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \frac{\partial(nv)}{\partial x} + \sigma(n, \rho) \quad (2.2)$$

onde x é a coordenada linear espacial e $\sigma(n, \rho)$ é uma função que combina em um único termo a fonte de novas pontas (ramificação) e a diminuição do número de pontas (junção de uma ponta de hifa a outra hifa, num processo chamado de anastomose).

Conforme a hifa consumia nutrientes do meio, o consumo foi calculado segundo Edelstein e Segel (1983), cuja equação de balanço de nutriente externo está representada em 2.3:

$$\frac{\partial C_{ex}}{\partial t} = D_c \frac{\partial^2 C_{ex}}{\partial x^2} - \frac{\rho}{L} \frac{K_{max} C_{ex}}{(K_n + C_{ex})} \quad (2.3)$$

Na equação 2.3, C_{ex} é a concentração de nutriente externo, D_c o coeficiente de difusão de nutriente no meio sólido, K_{max} a taxa máxima de absorção, K_n a constante de saturação para a absorção de nutriente e L é a espessura do meio. O parâmetro L é utilizado para converter as unidades de área para unidades de volume. O primeiro termo do lado direito da equação é a difusão segundo a Lei de Fick e o segundo tem o formato da equação de Monod, que descreve um processo saturável.

Uma vez absorvido pela hifa, o nutriente era translocado dentro da hifa por mecanismos de difusão e convecção (EDELSTEIN; SEGEL, 1983). O nutriente interno era utilizado para crescimento e manutenção:

$$\frac{\partial C_{in} \rho a}{\partial t} = - \frac{\partial}{\partial x} \left(- Da \rho \frac{\partial C_{in}}{\partial x} + a \rho C_{in} w \right) + \rho \frac{K_{max} C_{ex}}{(K_n + C_{ex})} - \rho a M - a n v Y \quad (2.4)$$

onde C_{in} é a concentração de nutriente dentro da hifa, a é a área da seção transversal da hifa, D o coeficiente de difusão de nutrientes dentro da hifa, w a velocidade de convecção dos nutrientes dentro da hifa, M o coeficiente de manutenção e Y o coeficiente de rendimento. Na equação 2.4, o primeiro termo do lado direito refere-se ao transporte de massa por difusão e convecção, respectivamente; o segundo ao substrato externo absorvido por um processo saturável e que passa a ser substrato interno; o terceiro está relacionado à taxa de manutenção e o quarto à produção de biomassa a partir das pontas.

O modelo previu uma alta densidade de hifas e pontas no centro da colônia e então uma diminuição da densidade conforme a distância do centro da colônia aumentava. Estas previsões concordaram com perfis experimentais de densidade de micélio de *Sclerotium rolfsii* em função do raio. Esta sequência de artigos foi a primeira a descrever o crescimento do micélio fúngico em colônia.

Outra sequência de trabalhos com modelos contínuos foi a de Davidson *et al.* (1996), Davidson (1998) e Davidson e Olsson (2000). Em Davidson e Olsson (2000), por exemplo, foi proposto um sistema de equações adaptado a partir de Davidson (1998). O sistema era formado por três elementos principais: uma densidade de biomassa m , uma concentração interna de substrato s_i e uma concentração externa de substrato s_e , substrato esse que, entretanto, não banhava toda a hifa (Figura 2.6). A translocação de nutrientes foi assumida, a princípio, como ocorrendo puramente por difusão dentro da biomassa, segundo a Lei de Fick. O crescimento fúngico e o consumo de substrato foram também modelados por um sistema de equações do tipo difusão-reação, onde os termos do fluxo e reação foram escolhidos de forma a representar características qualitativas importantes do crescimento do micélio, como a translocação de nutrientes e a produção de biomassa, por exemplo.

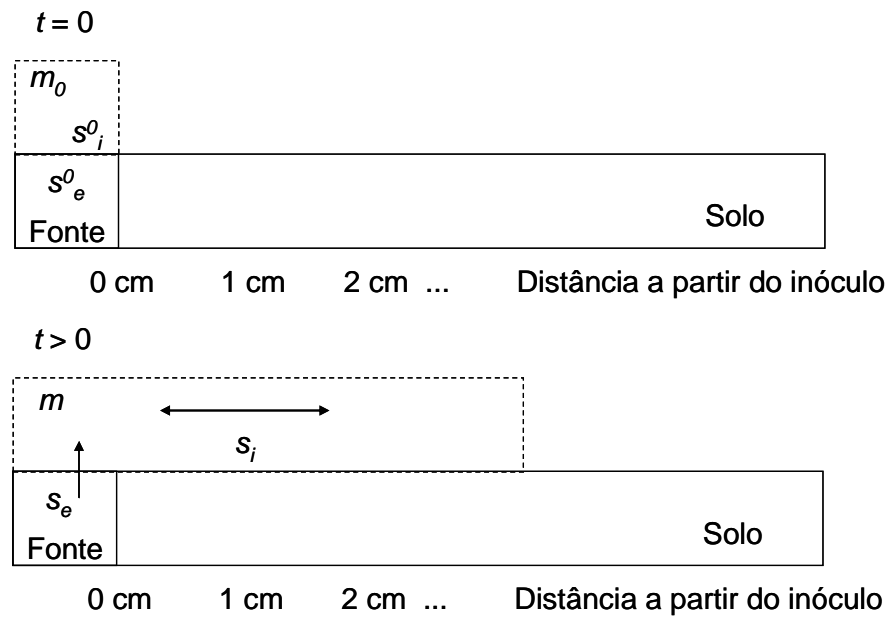


FIGURA 2.6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO DE DAVIDSON E OLSSON (2000)

Os símbolos m_0 , s_i^0 e s_e^0 representam os valores iniciais das variáveis m , s_i e s_e , as quais representam a densidade de biomassa e a concentração do substrato interno e substrato externo, respectivamente.

Davidson e Olsson (2000) propuseram que a densidade de biomassa m era uma função do espaço x e do tempo t ($m(x,t)$). Essa biomassa expandia sobre o meio em um processo análogo à difusão, processo este dependente da concentração de substrato interno s_i . Como a biomassa é imóvel, este movimento não deve ser visto como o movimento de biomassa existente, mas sim como a propensão de nova biomassa produzida de crescer para longe de áreas já com alta densidade de biomassa através do movimento das pontas. A biomassa era produzida a uma velocidade também dependente da concentração de s_i e era autolimitante devido a restrições espaciais, já que a biomassa possuía um volume. Assim, a velocidade de formação de biomassa era dada pela equação 2.5:

$$\frac{\partial m}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_m s_i \frac{\partial m}{\partial x} \right) + c_1 m^2 \left(\frac{s_i}{k_1 + s_i} - m \right) \quad (2.5)$$

onde D_m , c_1 e k_1 são constantes positivas. O primeiro termo do lado direito da equação representa, então, a expansão da biomassa sobre o meio e o segundo o crescimento limitado.

Davidson e Olsson (2000), seguindo o as equações propostas por Davidson (1998), consideraram que a variação do substrato interno dependia do fluxo do substrato e da quantidade que reagia para crescimento ou manutenção:

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_i m \frac{\partial s_i}{\partial x} \right) - c_2 m^2 \frac{s_i}{k_1 + s_i} + c_3 s_i \frac{s_e}{k_2 + s_e} - c_4 m s_i \quad (2.6)$$

onde D_i , c_2 , c_3 , c_4 e k_2 são constantes positivas e s_e é a concentração de substrato externo. Na equação 2.6, o primeiro termo do lado direito representa o fluxo de s_i dentro da rede do micélio. A proposta dos autores era que este fluxo é correlacionado linearmente à densidade de biomassa m . O segundo termo refere-se ao gasto de s_i para o crescimento; o terceiro representa o transporte ativo de nutrientes de fora da biomassa para dentro dela através da membrana, e o quarto termo eles definiram como um termo de “diferentes tipos de perda de energia”.

O balanço do substrato externo, localizado no ponto de inoculação, era simplesmente a quantidade do substrato que foi consumida pelo transporte ativo através da membrana:

$$\frac{\partial s_e}{\partial t} = -c_6 c_3 s_i \frac{s_e}{k_2 + s_e} \quad (2.7)$$

onde c_6 é uma constante positiva incluída na equação para levar em consideração que o substrato removido do exterior e transportado para o interior da hifa teria efeitos diferentes sobre as concentrações de substrato interno e externo, devido a gastos energéticos no transporte.

Os autores mostraram perfis de extensão da biomassa a partir do ponto de inoculação e perfis de concentração de nutrientes em função do comprimento e compararam estes últimos com dados experimentais obtidos por Persson, Olsson e Jansson (2000) (dados estes mostrados na Figura 2.7). Os dados experimentais obtidos por eles foram da distribuição da sonda radioativa de 3-O-metilglucose. Esta sonda não era metabolizada pelo fungo, não podia ser incorporada em compostos

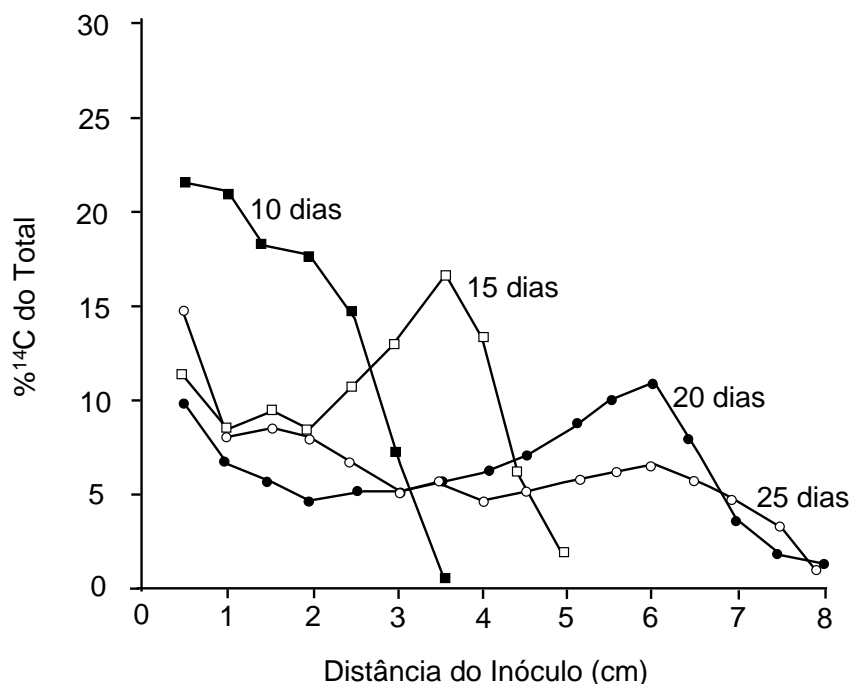


FIGURA 2.7 – DISTRIBUIÇÃO DE ¹⁴C EM PLACAS INOCULADAS COM *Arthrobotrys superba* SOBRE UM PEDAÇO DE MADEIRA ISOLADA E CRESCENDO SOBRE SOLO TRATADO COM O CALOR

FONTE: Persson, Olsson e Jansson (2000). As barras de erro foram omitidas.

estruturais como a parede celular e não podia funcionar como substrato respiratório e, com isto, os autores disseram que refletiria o *pool* de glucose dentro da célula. A equação para o balanço da sonda era análogo à equação 2.6, porém somente com o termo de transporte e sem os termos de reação, já que a sonda não era consumida:

$$\frac{\partial I}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_l m \frac{\partial I}{\partial x} \right) \quad (2.8)$$

onde D_l é uma constante positiva e $I(x,t)$ representa a concentração de ¹⁴C.

Como o modelo, conforme descrito anteriormente, não previu adequadamente os perfis de distribuição da sonda, os autores propuseram que deveria haver um outro mecanismo que não apenas simples difusão para dirigir o processo de translocação de nutrientes. Eles assumiram então que o fluxo difusivo de substrato interno seria aumentado por um fluxo convectivo. Este fluxo seria “ativo” porque a velocidade seria proporcional à própria concentração de substrato

interno. Este fluxo ativo poderia ser então sumariizado como $Kms_i v(s_i)$, onde K é uma constante positiva e $v(s_i)$ a velocidade de convecção. Foi assumido que a área transversal de todas as hifas no micélio era proporcional à biomassa naquele ponto e, por isso, o fluxo ativo seria proporcional à m . Além disso, na ausência de evidências experimentais, eles assumiram que a função velocidade $v(s_i)$ era simplesmente $v_1 s_i$, onde v_1 era uma constante não negativa. Eles também propuseram que a sonda era movida por convecção de uma maneira similar: $Km/v_2 s_i$, onde v_2 era uma constante negativa. O termo tinha este formato porque a sonda não podia ser metabolizada pelo fungo e então a velocidade de convecção era proporcional à concentração do substrato interno disponível, e não proporcional à concentração da sonda.

Ao levar em consideração estas proposições, os termos referentes ao fluxo de massa de substrato interno e da sonda da equação 2.6 e 2.8 foram reescritos de acordo com as equações 2.9 e 2.10:

$$J_i = -D_i m \frac{\partial s_i}{\partial x} + K_1 m s_i^2 \quad (2.9)$$

$$J_l = -D_l m \frac{\partial l}{\partial x} + K_s m l s_i \quad (2.10)$$

onde J_i refere-se ao fluxo total de substrato interno, J_l ao fluxo total da sonda e K_1 e K_2 são constantes positivas.

Ao incluir o termo convectivo nas equações, as simulações do modelo de Davidson e Olsson (2000) descreveram perfis semelhantes aos dados experimentais da Figura 2.7 e que não haviam sido obtidos quando a difusão era assumida como o único mecanismo de transporte. Isto evidenciou a importância que diferentes mecanismos de transporte exercem sobre o crescimento do micélio fúngico.

Após este trabalho de Davidson e Olsson (2000), seguiram vários de um mesmo grupo que realizaram a modelagem do micélio fúngico em solo através de um conjunto de EDPs e também incluíram no modelo um termo de translocação ativa (BOSWELL *et al.*, 2002; BOSWELL *et al.*, 2003a; BOSWELL *et al.*, 2003b), mas foram propostos para situações específicas e não serão aqui revisados.

Todos esses modelos contínuos revisados até aqui assumem que as variações ocorrem em apenas uma dimensão espacial (modelos unidimensionais), já

que enfocam o crescimento radial e planar em colônia (crescimento superficial). Além disso, não fazem distinção entre os tipos de hifas (aéreas ou penetrantes, por exemplo), uma vez que a dimensão de interesse é o plano, e não o crescimento vertical para “cima” ou para “baixo”. Uma outra característica é que eles assumem um único substrato genérico como fonte de nutrientes e não levam em consideração que esse substrato pode ser polimérico (e, portanto, enzimas precisam ser liberadas para que reajam com o substrato e liberem os monômeros).

O primeiro modelo a descrever explicitamente o crescimento das hifas aéreas foi o modelo de Nopharatana, Howes e Mitchell (1998), cujo esquema está mostrado na Figura 2.8. O modelo proposto foi do tipo difusão-reação e tratava as hifas aéreas como um conjunto de pontas que difundia pelo espaço. Foi assumido que o espaço por onde difundiam as hifas era preenchido por ar e hifas de maneira “pseudohomogênea” (ou seja, não havia diferenciação física entre hifa e ar, e cada ponto no espaço possuía propriedades médias ponderadas do ar e da biomassa naquela região). O oxigênio foi assumido como não limitante baseado em cálculos do módulo de Thiele, com o cálculo sendo feito para a densidade máxima de biomassa, e, por isso, a difusão e o consumo do oxigênio não foram incorporados ao modelo. No caso dos nutrientes, foi suposto que a glucose difundia a partir de uma fonte de concentração constante, localizada na superfície, até às pontas crescentes,

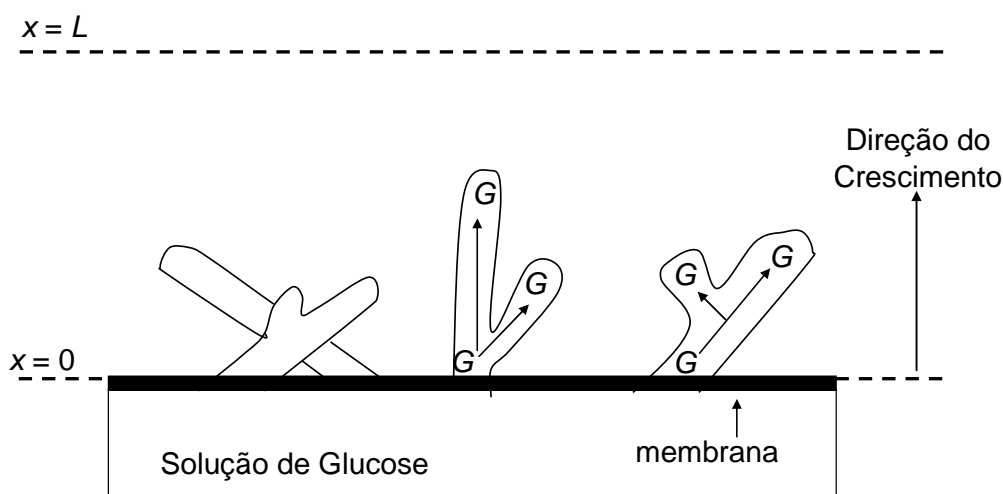


FIGURA 2.8 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO SISTEMA MODELADO POR NOPHARATANA, HOWES E MITCHELL (1998)

G é a glucose, x a direção de crescimento e L o espaço disponível acima da superfície para o crescimento.

podendo ser esgotada durante este transporte intracelular devido ao consumo para manutenção ou esgotada na ponta devido ao consumo para o crescimento.

As equações relevantes do balanço de massa, com as respectivas condições de contorno serão descritas a seguir. Primeiro, a equação para o balanço de glucose está descrita na equação 2.11:

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D_{hyp} \frac{\partial}{\partial x} \left(B \frac{\partial (G/B)}{\partial x} \right) - \frac{1}{Y_{X/G}} n v_{max} \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) a \rho - m B \quad (2.11a)$$

$$x = 0, G = C_b / \rho \quad (2.11b)$$

$$x = L, G = 0 \quad (2.11c)$$

onde a variável t é o tempo, x a altura acima da superfície, n a concentração de pontas, B a concentração de biomassa seca e G a concentração de glucose, todas estas concentrações baseadas no volume total. O parâmetro D_{hyp} é a difusividade de glucose na hifa, $Y_{X/G}$ o coeficiente de rendimento de biomassa a partir da glucose, v_{max} a velocidade máxima de extensão das pontas, B_m a concentração máxima de biomassa, k_t a constante de saturação de glucose, a é a área transversal da hifa, ρ é a densidade da hifa, m o coeficiente de manutenção, δ é o comprimento da zona de extensão, C_b é a concentração de glucose no substrato (assumido constante) e L o espaço disponível para o crescimento acima da superfície. O primeiro termo do lado direito da equação 2.11 diz respeito à difusão da glucose no interior da hifa, segundo a segunda Lei de Fick; o segundo termo está relacionado ao consumo de glucose para a produção de biomassa de acordo com a velocidade de extensão das pontas, ponderados por um termo logístico de biomassa e um termo saturável em relação à glucose; e o terceiro termo diz respeito consumo de glucose para a manutenção celular.

A velocidade de produção de biomassa foi calculada a partir do número de pontas n em uma posição particular em um dado tempo e com uma velocidade de alongamento da ponta, que foi assumida como dependente da concentração de glucose a uma distância δ atrás da ponta. O balanço de massa para a biomassa seca foi o seguinte:

$$\left. \frac{\partial B}{\partial t} \right|_x = nv_{\max} \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) a \rho \quad (2.12)$$

onde v_{\max} é a taxa de extensão da ponta, a é a área transversal de uma única ponta, ρ é a densidade da hifa, B_m a quantidade máxima de substrato e k_t uma constante de saturação. O primeiro termo entre parênteses refere-se ao crescimento logístico com uma quantidade máxima de biomassa B_m e o segundo refere-se à cinética de Monod para a concentração de glucose. Ambos os termos ponderam v_{\max} . O espaço da malha era igual a δ .

No modelo de Nopharatana, Howes e Mitchell (1998), as hifas formavam novas pontas e essas pontas se movimentavam no espaço; o movimento das pontas foi descrito como um processo difusivo. O seguinte balanço e condições de contorno foram utilizados para as pontas:

$$\left. \frac{\partial n}{\partial t} \right|_x = \alpha_t n \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) + \frac{\partial}{\partial x} \left(D_b \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) \frac{\partial n}{\partial x} \right) \quad (2.13a)$$

$$x = L, \quad n = 0, \quad B = 0 \quad (2.13b)$$

onde α_t é a taxa específica de geração de novas pontas e D_b o coeficiente de difusão das pontas no ar. Então, na equação 2.13, o primeiro termo da direita refere-se à produção de pontas como função da biomassa e da concentração de glucose e o segundo está relacionado à difusão destas pontas no espaço.

O modelo simulou perfis de concentração de biomassa em função da altura, mas não comparou os perfis preditos com dados experimentais. Mais tarde, Nopharatana (1999) utilizou microscopia confocal e análise de imagens e obteve uma estimativa da densidade de biomassa em função da altura que permitiu a comparação das previsões do modelo com os dados experimentais. Tanto os perfis simulados por Nopharatana, Howes e Mitchell (1998) quanto os perfis experimentais obtidos por Nopharatana (1999) são mostrados na Figura 2.9.

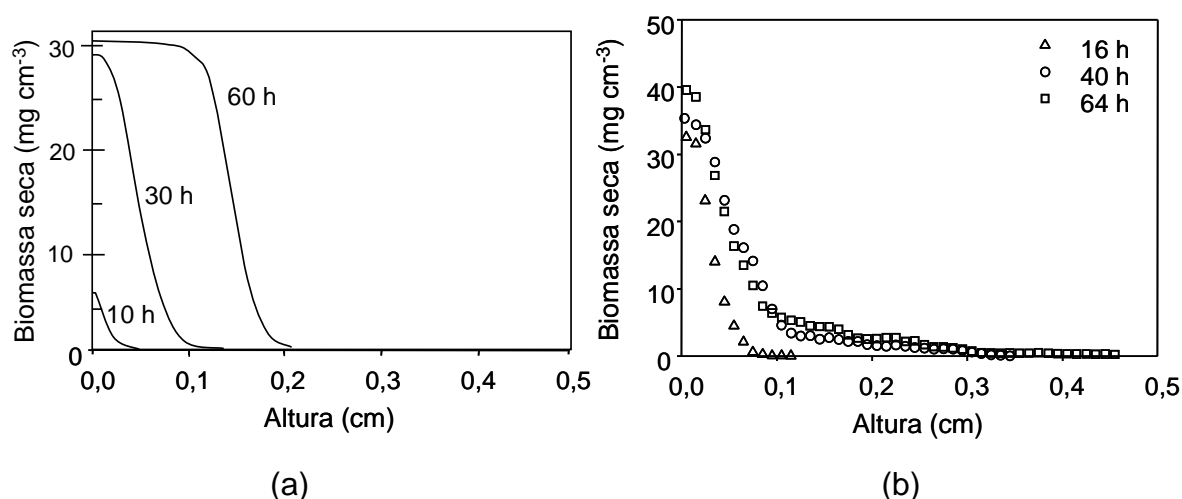


FIGURA 2.9 – PERFIS SIMULADOS E EXPERIMENTAIS DO CRESCIMENTO DE HIFAS AÉREAS

(a) Perfis simulados para as hifas aéreas por Nopharatana, Howes e Mitchell (1998) (b) Perfis experimentais do crescimento de hifas aéreas de *Rhizopus oligosporus* crescendo sobre o meio de cultivo *Potato Dextrose Agar* (PDA) obtido por Nopharatana (1999).

Embora o modelo de Nopharatana, Howes e Mitchell (1998) descrevesse algumas características importantes da variação de densidade com a altura, as hifas aéreas, conforme os dados experimentais, chegaram a alturas maiores do que as previstas pelo modelo. Além disso, o modelo previu um perfil de densidade para as hifas aéreas na forma de uma sigmoide com a concentração mais alta na superfície e uma diminuição da densidade com o aumento da altura. Quando a biomassa na superfície atingiu a densidade máxima B_m , o perfil de concentração de biomassa deslocou-se para frente até atingir uma altura tal que a glucose era completamente depletada nas pontas mais afastadas da superfície. O problema é que o modelo previu uma sigmoide simétrica, enquanto que os resultados experimentais proporcionaram uma sigmoide não simétrica. Em outras palavras, a previsão de que uma densidade máxima de biomassa é atingida em alturas acima de 0,05 cm não confere com os dados experimentais.

Além dos dados experimentais mostrados na Figura 2.9b, Nopharatana (1999) expandiu o modelo de Nopharatana, Howes e Mitchell (1999), incorporou o uso de substratos poliméricos e propôs equações para o crescimento das hifas penetrantes. No submodelo desenvolvido por Nopharatana (1999) para as hifas penetrantes, duas equações a mais foram incorporadas: uma para a difusão de enzima no substrato segundo a Lei de Fick e outra para a reação de hidrólise do

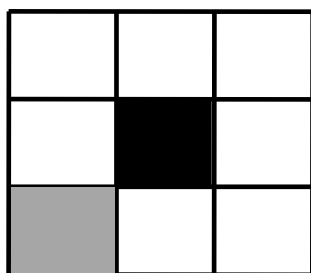
polímero (amido) em monômero (glucose), segundo uma cinética de Michaelis-Menten. Mesmo incorporando o uso de substratos poliméricos, os perfis de biomassa em função da altura foram semelhantes aos obtidos por Nopharatana, Howes e Mitchell (1998), e significativamente diferente dos dados experimentais.

Todos esses modelos contínuos descritos até aqui evidenciam o papel da difusão no transporte de nutrientes. No caso de hifas aéreas, entretanto, a difusão da glucose talvez seja insignificante se comparada à quantidade transportada pelo fluxo citoplasmático (RAHARDJO; TRAMPER; RINZEMA, 2005). Como sugere Lew (2005), ao trabalhar com hifas superficiais, o fluxo citoplasmático é provavelmente originado por gradientes osmóticos causados por diferentes transportes de íons dentro da hifa. O mesmo autor sugere também que o citoplasma apical migra na mesma velocidade da extensão da hifa. Existem evidências, entretanto, também obtida de hifas superficiais, de que a evaporação de água em uma área do micélio pode dirigir a translocação de massa para aquela área (JENNINGS, 1995) e, portanto, um fluxo de massa convectivo, não necessariamente associado à extensão, pode ser também uma característica importante a ser incorporada.

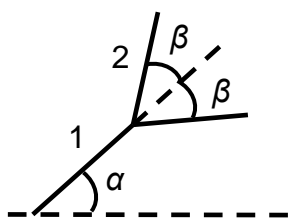
Ainda que a estratégia dos modelos contínuos seja bem sucedida para modelar redes densas, ela pode não ser apropriada para modelar micélios esparsos, como os que crescem em condições de baixa concentração de nutrientes e os que crescem em “alturas” distantes do substrato. Além disso, os modelos contínuos descrevem apenas a topologia e arquitetura do micélio e não fornecem uma representação morfológica explícita. Essa representação morfológica pode ser obtida através de modelos discretos, os quais serão revisados na próxima seção.

2.3.2 Modelos Discretos

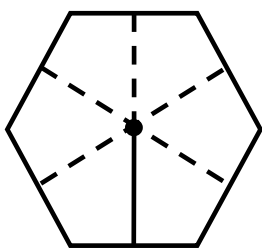
Nos modelos do tipo discreto, as hifas individuais são identificadas. Estes modelos geram imagens com grandes semelhanças com micélios reais e frequentemente são derivados de propriedades estatísticas do sistema experimental (DAVIDSON, 2007). Além da formação de redes explícitas onde o espaço ocupado por hifas é distinguido do espaço não ocupado, modelos discretos podem incorporar mais facilmente variações estocásticas no processo de crescimento. Esses modelos podem ser classificados em duas categorias: *lattice-based* ou *lattice-free* (Figura 2.10).



(a) Lattice-based quadrangular (adaptado de Laszlo e Silman, 1993): a ponta da hifa (quadrado preto) ocupa uma célula inteira e, ao alongar, só pode ocupar uma das células vizinhas em branco. Em cinza, o “segmento” de onde a ponta originou e agora é célula ocupada por biomassa.



(b) Lattice-free (adaptado de Carver e Boswell, 2008): o segmento de hifa 2 é resultante da ramificação do segmento 1. A hifa é livre para tomar qualquer direção no espaço, e os ângulos α e β não possuem valores fixos e podem ser diferentes.



(c) Híbrido contínuo-discreto (parte discreta do tipo *lattice-based* triangular - adaptado de Boswell *et al.*, 2007): os nutrientes estão distribuídos em “células” hexagonais. Cada uma delas pode conter apenas uma ponta de hifa (círculo preto). A linha sólida denota uma hifa existente e as pontilhadas as possíveis rotas de extensão da ponta da hifa.

FIGURA 2.10 – DESENHOS ESQUEMÁTICOS DOS SISTEMAS DE MODELAGEM FÚNGICA

2.3.2.1 Modelos Discretos *Lattice-based*

Um modelo *lattice-based* é essencialmente um autômato celular¹ (Figura 2.10a) (BOSWELL; HOPKINS, 2008). Os modelos de autômatos celulares são sistemas dinâmicos, onde o espaço é dividido em um conjunto de “células” e as variáveis do modelo assumem valores discretos dentro de cada célula. Essas variáveis são alteradas em passos de tempo também discretos, e mudam seu estado dependendo do próprio estado da célula e do estado das células vizinhas. Na modelagem de fungos através de autômatos celulares, o micélio é, então, confinado a essa geometria (malha) regular.

No caso do crescimento planar, as hifas são confinadas em células de uma geometria regular que tipicamente é quadrada (LASZLO; SILMAN, 1993) ou triangular (BOSWELL *et al.*, 2007). Essa geometria regular permite a modelagem explícita da ramificação e da anastomose (fusão de uma ponta de hifa com outra hifa). A “aquisição” de nutrientes a partir de células vizinhas e a translocação também podem ser modeladas. Os fenômenos ocorrem através da atualização do sistema como um todo (ou seja, a atualização de todas as células simultaneamente), a qual ocorre em intervalos de tempo discretos e regulares de acordo com uma combinação de regras determinísticas e estocásticas.

Um exemplo de sistema *lattice-based* (do tipo autômato celular) é mostrado na Figura 2.10a, que é o sistema de Laszlo e Silman (1993). Este foi o primeiro e até o momento o único modelo a utilizar autômatos celulares para simular o crescimento de fungos em colônia em um sistema que os autores chamam de FES. O modelo consistia em uma malha bidimensional de 320 x 200 sítios quadrangulares de crescimento onde a colônia se desenvolvia a partir de um único esporo semeado no centro da malha. Permitia-se ao programa efetuar vários passos até que algum

¹ O exemplo clássico do uso de autômatos celulares (do inglês *cellular automata* - CA) é o Jogo da Vida (*Game of Life*), proposto em 1970 por J. H. Conway baseado em um problema teórico de outro matemático chamado John von Neumann. O jogo trata-se de um reticulado bidimensional onde cada quadrado pode estar “ligado” (vivo) ou “desligado” (morto). De acordo com Conway, uma célula viva morre no instante seguinte por isolamento, se tiver um ou nenhum vizinho vivo naquele instante, ou por sufocamento, caso tenha quatro ou mais vizinhos. Uma célula com dois vizinhos vivos não muda de estado, enquanto uma célula com três vizinhos vivos estará viva no instante seguinte (GARDNER, 1970).

ponto da colônia atingisse um dos limites do sistema. Ao se olhar para um quadrado qualquer da malha (quadrado preto na Figura 2.10a), verifica-se que ele possui 8 vizinhos. A condição mais simples testada pelos autores foi a de que, se um sítio na vizinhança de um dado quadrado estava ocupado, então aquele quadrado se tornaria ocupado de acordo com uma probabilidade definida pelo número de vizinhos também ocupados. Como exemplo, a primeira regra testada foi: 1 vizinho, 12,5% de probabilidade de o quadrado central se ocupar; 2 vizinhos, 25%; 3 vizinhos, 50%; 4-8 vizinhos, 0%; ou seja, a probabilidade aumentava com a quantidade de vizinhos até um limite, e então muitos vizinhos evitavam que o espaço fosse ocupado, como se fosse pela ausência de nutrientes e presença de inibidores.

Os autores também testaram outras regras, entre elas a seguinte: sítios desocupados “envelheciam” probabilisticamente se sítios vizinhos estivessem ocupados. Após alguns passos de “envelhecimento”, sítios desocupados tornavam-se indisponíveis para o crescimento. Isto buscava incorporar o efeito de redução de nutrientes (devido à difusão para sítios ocupados) ou acumulação de substâncias tóxicas inibitórias. Regras para mudança de estado de hifas (de estado vegetativo para reprodutivo) também foram testadas.

O que vale destacar aqui é a simplicidade do modelo e a capacidade de incorporar comportamentos complexos por meio de regras simples. Como os próprios autores Laszlo e Silman (1993) destacam, o modelo difere radicalmente de aproximações tradicionais baseadas em equações matemáticas, já que os CA são dirigidos inteiramente por regras lógicas empíricas. O método permite o rápido desenvolvimento, teste e modificação do modelo. Os resultados, porém, foram apenas visuais e qualitativos, sem qualquer relação com parâmetros reais de crescimento fúngico. Além disso, em modelos *lattice-based* em geral, como o crescimento é confinado em uma geometria regular, a geometria também regular da rede resultante pode não representar bem as características irregulares dos micélios fúngicos (CARVER; BOSWELL, 2008).

2.3.2.2 Modelos Discretos *Lattice-free*

Os modelos *lattice-free* (Figura 2.10b), também conhecidos como modelos *vector-based*, tratam o micélio como um conjunto de segmentos de linhas que são livres para tomar qualquer orientação em um ambiente que pode ser planar, o que é feito na maioria dos modelos deste tipo, como Hutchinson *et al.* (1980) e Yang *et al.* (1992), ou tridimensional, como nos modelos de Meškauskas *et al.* (2004 a,b) e Carver e Boswell (2008). Estes modelos são ideais para modelar o crescimento de colônias menores (BOSWELL; HOPKINS, 2008).

Nos modelos *lattice-free*, as posições da ponta no espaço e de cada segmento ligando os comprimentos da hifa são armazenadas. A cada iteração, a ponta avança de acordo com um conjunto de regras e interação com campos locais. Em Carver e Boswell (2008), por exemplo (Figura 2.10b), a estrutura do micélio foi modelada como uma coleção de segmentos de linhas de comprimento fixo conectados em um plano. Foi assumido que um único substrato genérico era o responsável pelo crescimento e que a concentração dele era uniforme dentro de um dado segmento de hifa, podendo ser diferente em segmentos diferentes. Os nutrientes difundiam de um segmento ao outro a partir de uma fonte inesgotável isolada no ponto onde as hifas se originavam. As hifas em si se desenvolviam no plano em um ambiente livre de nutrientes, já que os nutrientes provinham apenas do local onde as hifas se originavam e não eram absorvidos ao longo da hifa.

Cada segmento de linha foi representado matematicamente por um vetor de quatro dimensões $v = (x, y, \theta, E)$, onde x e y eram as coordenadas cartesianas da posição de início de cada segmento de linha, θ estava entre $-\pi$ e π e denotava o ângulo que o segmento de linha formava com o eixo positivo de x e E representava a concentração de substrato contida no segmento de linha. O tempo foi modelado a passos discretos e, ao final de cada tempo, a rede podia expandir devido à criação de novas hifas (ramificação) e à extensão das hifas já existentes. Foram também descritos os fenômenos de fusão de hifas (anastomose) e movimento de nutriente dentro da hifa (translocação).

A ramificação foi assumida como sendo dicotômica (apical), ou seja, a ponta de uma hifa bifurcava para produzir duas pontas. Um segmento de linha da periferia da rede ramificava com uma probabilidade bE , onde b é uma constante não-negativa

e E a quantidade de substrato dentro aquele segmento de hifa. Para simular o processo, um número aleatório, uniformemente distribuído em um intervalo entre $[0,1]$, era selecionado e, se o número era menor do que bE , então a ramificação ocorreria. O ângulo de ramificação era escolhido também aleatoriamente, porém dentro de uma distribuição normal cujo desvio padrão representava o desvio padrão encontrado experimentalmente entre os ângulos de ramificação. Após a ramificação, um dos novos segmentos de linha recebia o “rótulo” da hifa já existente, enquanto o outro era visto como uma nova hifa e representado como uma nova entidade cujos dados eram armazenados.

Os segmentos de hifa da periferia que não ramificavam eram verificados quanto à possibilidade de apenas estender. Desde que houvesse uma quantidade de substrato excedendo uma quantidade c , a hifa estendia através da geração de um novo segmento de linha, que iniciava no final do segmento já existente e cujo ângulo era escolhido aleatoriamente a partir de uma distribuição normal. O desvio padrão da distribuição normal estava relacionado com dados experimentais sobre mudanças na direção de uma hifa (mesmo na ausência de ramificação).

Neste modelo de Carver e Boswell (2008), o movimento de nutrientes foi modelado como ocorrendo puramente por difusão. A mudança de quantidade de nutrientes em um segmento de linha k em um período de tempo era dada pela equação 2.14:

$$\Delta E_k = \sum_{\text{segmentos conectados } j} D \frac{E_j - E_k}{h} \quad (2.14)$$

onde o coeficiente de difusão D era suficientemente pequeno em relação a h (o comprimento de um segmento de hifa) para permitir estabilidade numérica.

Os autores usaram o modelo para gerar imagens de colônias fúngicas expandindo de maneira planar a partir de uma fonte central de nutrientes, em diferentes condições de substrato inicial e com diferentes valores para o coeficiente de difusão D . Eles quantificaram a dimensão fractal da rede resultante. Todos os parâmetros utilizados, entretanto, possuíam valores empíricos e os resultados foram apenas visuais, sem qualquer validação experimental.

Modelos do tipo *lattice-free*, como o modelo de Carver e Boswell (2008) exemplificado acima, são computacionalmente custosos, já que requerem a

comparação das posições das pontas e dos segmentos a cada passo no tempo para localizar intersecções que podem resultar em anastomose, por exemplo. Como as pontas podem se mover livremente pelo espaço, o número de combinações possíveis é muito grande, o que dificulta a aplicação deste tipo de abordagem. Entretanto, vale ressaltar que estes modelos geram imagens significativamente mais realistas do que aquelas obtidas com modelos *lattice-based*, uma vez que não há restrições geométricas para a localização das pontas. A desvantagem é que as previsões destes modelos são difíceis de comparar com dados experimentais.

2.3.3 Modelos Híbridos Contínuo-Discretos

Quando se deseja ter uma estrutura conhecida e uma representação visual para as hifas, os modelos do tipo discreto são adequados. Entretanto, os nutrientes em geral são muito menores em escala, mais finamente distribuídos e então mais adequados para serem modelados como variáveis contínuas. Modelos que misturam variáveis contínuas e discretas são chamadas de modelos híbridos (Figura 2.10b).

Essa estratégia de modelo híbrido foi adotada por Boswell *et al.* (2007) para simular o crescimento planar em colônia de fungos no ambiente heterogêneo do solo e por Boswell (2008) para simular o crescimento tridimensional no mesmo ambiente. Nesses modelos, chamados pelos autores de “autômatos celulares híbridos”, foi possível incorporar não somente o crescimento, ramificação e difusão de nutrientes, mas também o fenômeno da anastomose (junção de hifas).

Em Boswell *et al.* (2007), o domínio de crescimento foi inserido em um arranjo hexagonal de células contendo substrato externo que difundia entre as células vizinhas a uma taxa proporcional ao gradiente de concentração. Então, as mudanças na concentração de substrato externo s_e em uma célula hexagonal k devido à difusão em um período de tempo Δt eram dadas por:

$$\Delta_{diff} s_e(k) = D_e \frac{\Delta t}{\Delta x} \sum_{\text{células conectadas } j} \frac{s_e(j) - s_e(k)}{\Delta x} \quad (2.15)$$

onde Δx é a distância entre os centros de células adjacentes e D_e o coeficiente de difusão. Essa forma de difusão de substrato é essencialmente a discretização por diferenças finitas do termo correspondente na Lei de Fick.

Dentro da estrutura hexagonal contínua, foi inserida uma malha triangular, cujos vértices estavam nos centros das células hexagonais (veja Figura 2.10c). Os vértices dos triângulos poderiam ou estar ocupado por hifa ativa, hifa inativa ou estar “não ocupados” e, portanto, disponível para o crescimento da hifa. O substrato era internalizado a uma taxa equivalente ao do modelo contínuo e então transportado através da rede das hifas por meio de uma combinação de difusão e translocação por transporte ativo (com gasto energético). O componente difusional do substrato interno (s_i) foi modelado de maneira similar ao externo (equação 2.15), onde células adjacentes eram conectadas somente se havia hifa ativa as ligando. O componente ativo de transporte foi modelado da seguinte maneira:

$$\Delta_{ativo} s_i(k) = D_a \frac{\Delta t}{\Delta x} \sum_{j \leftrightarrow k} \begin{cases} \frac{\Omega(k) - \Omega(j)}{\Delta x} s_i(j), & \text{se } \Omega(k) - \Omega(j) \\ \frac{\Omega(k) - \Omega(j)}{\Delta x} s_i(k), & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (2.16)$$

onde $\Omega(k)$, definido como uma função linear negativa da distância da célula k para a ponta mais próxima, denotava a demanda por substrato interno e $j \leftrightarrow k$ são as células j conectadas a k por hifas ativas. Esta função buscava incorporar a ideia de que as pontas de hifas são as regiões de maior gasto de energia e, portanto, possuíam a maior demanda por substrato interno no sistema.

O movimento das pontas foi modelado através de um passeio pseudo-aleatório nos vértices da estrutura triangular. A parte aleatória estava relacionada com o aspecto difusivo do movimento das pontas, enquanto a não-aleatória era referente a um movimento dirigido. As probabilidades de crescimento dirigido e difusivo ao fim de cada passo Δt eram, respectivamente:

$$P(\text{dirigido}) = v s_i \frac{\Delta t}{\Delta x} \quad (2.17)$$

$$P(\text{difusivo}) = D_p s_i \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \quad (2.18)$$

onde D_p e v são parâmetros não negativos. Nas equações 2.17 e 2.18 o componente dirigido atua somente na direção de crescimento existente e o componente difusivo em uma das três direções que formam ângulos agudos com o eixo de crescimento. Como as hifas não exibem crescimento com ângulos obtusos, a probabilidade de direcionar a hifa através de uma mudança tão grande que causasse um ângulo desses foi definida como sendo igual a zero.

O custo energético para a formação de um novo segmento de hifa era representado por uma quantidade retirada da concentração de substrato interno correspondente ao custo para produzir um novo segmento. A ramificação foi assumida também como dependente da concentração de substrato interno, sendo que esta ramificação, assim como o redirecionamento, também ocorria em ângulos agudos somente. Caso a hifa se movesse para uma célula hexagonal que já contivesse outros segmentos de hifa, era considerado a formação de uma ligação (anastomose) e a ponta da hifa era removida do sistema. A hifa tornava-se inativa se a concentração de substrato interno estivesse abaixo da concentração crítica. Apesar de continuar fazendo parte da estrutura da rede, esta hifa inativa não mais exercia seu papel na absorção e translocação de nutrientes.

Em Boswell (2008) um modelo análogo foi desenvolvido, com as mesmas regras, porém em três dimensões. A estrutura contínua do modelo, representado por um arranjo de células hexagonais em 2D (Figura 2.10c), foi modelada em 3D como um volume empacotado de camadas de esferas de mesmo raio, onde cada camada possuía a mesma formação hexagonal básica; entretanto, camadas subsequentes possuíam alinhamentos diferentes que eram repetidos a cada três camadas. Exceto nas bordas, cada esfera estava em contato com 12 vizinhos: seis da própria camada, três da camada diretamente acima e três da camada diretamente abaixo. Os centros das esferas eram as possíveis localizações das pontas de hifas, enquanto as linhas conectando centros de elementos adjacentes foram usadas para denotar as possíveis localizações de hifas.

Vale destacar que nesses dois modelos as hifas foram tratadas como linhas efetivamente sem espessura por serem proporcionalmente muito menores do que o ambiente do solo ao redor. Esses modelos incorporaram características importantes

dos micélios fúngicos e foram os primeiros a simularem o crescimento fúngico de forma híbrida em uma vasta gama de condições. Apesar de gerarem imagens bastante realistas, os modelos não foram validados experimentalmente.

2.3.4 Comparação entre Modelos Contínuos e Modelos Discretos

Mais do que estratégias distintas, os tipos de modelagem apresentados nas seções anteriores são complementares: há uma relação direta entre as duas aproximações que permite a construção e calibração de modelos consistentes. Por exemplo, a frequência de ramificação em modelos contínuos (a média de número de ramificações por unidade de comprimento de hifa por unidade de substrato por unidade de tempo) pode ser diretamente convertida para uma probabilidade de ramificar em um comprimento de hifa que contém uma quantidade específica de substrato em um dado intervalo de tempo. Assim, taxas observadas e calibradas em nível contínuo podem ser mapeadas em probabilidades em nível discreto. Isso implica que, quando é realizado um grande número de simulações, os resultados médios dos modelos discretos serão consistentes com os mesmos resultados dos modelos contínuos (BOSWELL; HOPKINS, 2008).

A estratégia de modelagem mais apropriada depende da aplicação. A estratégia do tipo contínua é um ponto de partida para modelar o crescimento de fungos filamentosos na escala de micélio em sistemas de geometria simples. Entretanto, ela pode se tornar matematicamente custosa quando o crescimento é considerado em ambientes mais complexos e heterogêneos ou quando maiores detalhes precisam ser avaliados e incorporados ao modelo na forma de equações.

Os modelos discretos do tipo *lattice-free*, como ressaltado anteriormente, geram estruturas visuais que são mais parecidas com o micélio fúngico do que aquelas obtidas com modelos discretos do tipo *lattice-based*; entretanto, são computacionalmente custosos. Os modelos híbridos contínuo-discretos têm se mostrados promissores (BOSWELL, 2008).

Em síntese, tem-se que modelos do tipo contínuo baseados em EDPs são recomendáveis para problemas de larga escala; modelos discretos *lattice-based* são essenciais ao considerar o crescimento e função de fungos em ambientes

complexos; e modelos *lattice-free* são desejáveis ao se considerar escalas pequenas em ambientes sem limitações (BOSWELL; HOPKINS, 2008).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

À exceção do modelo contínuo desenvolvido por Nopharatana, Howes e Mitchell (1998) e depois ampliado por Nopharatana (1999), não há relatos de modelos que tenham sido desenvolvidos especificamente para as hifas aéreas, bem como não foram encontrados outros trabalhos de quantificação da densidade de biomassa em função da altura acima da superfície sobre a qual o fungo está crescendo. Este modelo, entretanto, foi feito para apenas uma dimensão (apesar do crescimento se dar em três dimensões). Além disso, o modelo não foi capaz de descrever o perfil de biomassa obtido experimentalmente e estratégias novas precisam ser utilizadas para tentar descrever o arranjo das hifas. Nesse modelo de crescimento das hifas aéreas, a difusão era o único mecanismo de translocação, por ser o mecanismo mais conhecido de transporte de massa em fungos que crescem na superfície do meio (OLSSON; JENNINGS, 1991). O papel do fluxo citoplasmático ou algum outro tipo de fluxo convectivo que possa colaborar para o transporte de nutrientes até às pontas ainda precisa ser investigado, tanto experimentalmente quanto através de modelos matemáticos.

Os modelos híbridos de Boswell *et al.* (2007) e Boswell (2008), apesar de promissores e de permitirem a investigação bidimensional e tridimensional do arranjo das hifas, foram desenvolvidos de maneira específica para descrever o crescimento de fungos na colonização de solos, na tentativa de compreender os fenômenos que estão envolvidos neste processo. Além disso, os autores não validaram experimentalmente os resultados e o sistema não permite obter dados quantitativos de biomassa, já que as hifas são tratadas como linhas efetivamente sem espessura. Com isso, apesar do potencial para descrever sistemas complexos, os modelos discretos e os modelos híbridos ainda não foram utilizados para descrever o arranjo tridimensional das hifas aéreas para fungos que crescem acima de uma superfície nutritiva em contato com o ar.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi de estabelecer uma abordagem apropriada para a modelagem do crescimento de hifas fúngicas no ar acima de uma superfície de um meio úmido e nutritivo. Os objetivos específicos foram:

- a) desenvolver um sistema matemático tridimensional apropriado baseado nos autômatos celulares e ajustar este modelo do tipo discreto aos dados experimentais obtidos por Nopharatana (1999) de densidade de biomassa fúngica em função da altura;
- b) desenvolver uma abordagem apropriada para descrever os fenômenos do alongamento, consumo de nutrientes, difusão e fluxos citoplasmáticos dentro de uma única hifa se alongando, avaliando a aplicabilidade da mesma como uma ferramenta que posteriormente possa ser integrada ao modelo desenvolvido no item (a);
- c) utilizar os modelos dos itens (a) e (b) para gerar hipóteses sobre como os fenômenos físicos e biológicos interagem para controlar a velocidade e a forma de crescimento de hifas aéreas.

4 MODELAGEM DO MICÉLIO FÚNGICO POR MEIO DE AUTÔMATOS CELULARES

Neste capítulo, um modelo baseado no conceito dos autômatos celulares é desenvolvido para descrever o crescimento de hifas aéreas de um fungo filamentosso crescendo na superfície de um meio úmido e nutritivo. O conceito de autômatos celulares (do inglês *cellular automata*, plural de *cellular automaton* – CA) vem ao encontro de muitas lacunas nos modelos que descrevem o crescimento de fungos filamentosos. O mundo de um autômato é local, discreto e baseado numa sequência de regras lógicas e na interação com a vizinhança. Assim, as pontas das hifas podem ser vistas como unidades que interagem tanto com o meio (em vista da disponibilidade de nutrientes) quanto com os vizinhos, que são as células da malha contendo outras pontas ou biomassa fúngica ao redor.

Um autômato celular consiste em uma malha formada por um conjunto regular de células; cada uma destas células, em um dado instante de tempo, pode estar em um número finito de estados. O tempo também é discreto, e o estado de uma célula em um dado tempo t é função do estado dos vizinhos em um tempo $t-1$. Cada célula possui as mesmas regras para atualizar, com base nos valores da vizinhança, e isso acontece a cada passo no tempo.

Apesar da simplicidade aparente, os autômatos celulares são capazes de gerar comportamentos complexos. Isto faz deles particularmente interessantes para descrever sistemas biológicos que apresentam um elevado grau de não-linearidade espacial e são difíceis de representar com um conjunto de equações diferenciais (WIMPENNY; COLASANTI, 1997). Os CA já foram amplamente usados em simulações de sistemas biológicos, incluindo a morfologia de colônias bacterianas.

Um modelo discreto baseado nas ideias de CA foi desenvolvido para descrever o arranjo das hifas aéreas em superfícies úmidas e nutritivas em contato com o ar. Apesar de as ideias iniciais do modelo virem de sistemas do tipo autômato celular (que é *lattice-based*), será possível observar, ao longo da descrição do modelo e da discussão dos resultados, que o sistema desenvolvido apresenta também características de outros tipos de modelagem, como os modelos do tipo *lattice-free* (explicados na seção 2.3.3.2).

SIMBOLOGIA DO MODELO

A, B, C	– número de cubos adicionados em 1D, 2D e 3D, respectivamente
d	– distância percorrida entre ramificações (μm)
DI	– densidade superficial de inoculação de esporos (esporos mm^{-2})
G	– probabilidade de um esporo germinar (%)
L	– lado do cubo (μm)
m	– número inteiro que multiplica o conjunto de números A, B e C
mov_{npmax}^R	– número máximo de movimentos não permitidos para hifas reprodutivas
mov_{npmax}^V	– número máximo de movimentos não permitidos para hifas vegetativas
P_+, P_0, P_-	– probabilidade de uma hifa tomar uma direção para cima, no mesmo nível ou para baixo, respectivamente
$P_{V \rightarrow R}$	– porcentagem das hifas vegetativas viáveis que se tornam reprodutivas (%)
t	– tempo (h)
t_d	– tempo no qual ocorre a diferenciação (h)
tip_{max}	– número máximo de pontas no sistema
t_r	– espaço de tempo entre duas ramificações (h)
$tstep_{max}$	– número total de passos no tempo
t_{total}	– tempo total de simulação (h)
v_{ext}^R	– velocidade de extensão das hifas reprodutivas ($\mu\text{m h}^{-1}$)
v_{ext}^V	– velocidade de extensão das hifas vegetativas ($\mu\text{m h}^{-1}$)
z	– altura de uma ponta, em número de cubos
z_{max}	– número máximo de cubos na altura do sistema
α	– parâmetro auxiliar da distribuição de probabilidade nos cubos vizinhos para hifas vegetativas (%)
ρ_{hifa}	– densidade da biomassa fúngica ($\text{mg-biomassa-seca cm}^{-3}$)

4.1 DESCRIÇÃO DO SISTEMA

4.1.1 Características Gerais do Sistema

O sistema desenvolvido é baseado na existência de um conjunto de cubos organizados como em uma matriz tridimensional (Figura 4.1), em que cada ponta de hifa ocupa um local (um cubo) no espaço e, durante a simulação, muda de posição no espaço, deixando atrás dela um rastro que representa a biomassa da hifa atrás da ponta. O movimento de uma ponta dependerá dos 26 vizinhos mais próximos. Essa matriz facilita a resolução do modelo, uma vez que tem relação com uma matriz tridimensional na linguagem computacional utilizada para a resolução. O lado do cubo (L) foi selecionado de modo a ter-se uma área transversal (L^2) similar à área transversal de uma hifa fúngica que é, efetivamente, cilíndrica.

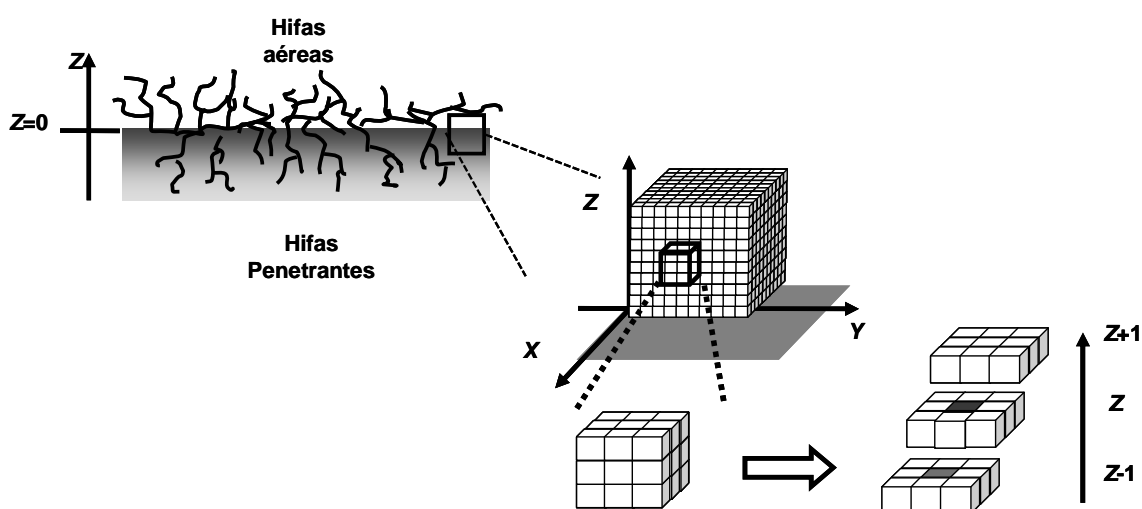


FIGURA 4.1 – CORTE TRANSVERSAL DE UMA PARTÍCULA ONDE OCORRE CRESCIMENTO E O ESPAÇO VIRTUAL DO MODELO

Em destaque em um cubo preto, na direita, uma ponta de hifa e seus 26 vizinhos próximos. O cubo em cinza no plano inferior ($z-1$) representa o um local por onde a ponta já passou e agora está ocupado por uma quantidade de biomassa representando o rastro de hifa.

Cada elemento na matriz pode assumir um de três estados: (1) espaço vazio; (2) ponta de hifa; (3) rastro de hifa. O estado de cada célula pode mudar somente nesta ordem: (1) \rightarrow (2) \rightarrow (3). Quando o elemento na matriz contém zero,

isto indica que o espaço está vazio. Quando o elemento contém um número inteiro, isto indica o número da hifa que ocupa aquele espaço.

A simulação envolve iterações sucessivas durante as quais cada ponta de hifa escolhe uma direção particular e move certo número de cubos naquela direção. Neste modelo, uma iteração corresponde a um espaço de tempo entre duas ramificações da ponta (t_r). Conforme a ponta da hifa se move através de posições na matriz, ela deixa atrás dela um “rastros” de biomassa, o qual representa o “tubo” de hifa atrás da ponta da hifa (ou seja, os cubos que foram sucessivamente ocupados). Novas pontas de hifas são geradas através do evento da ramificação, que ocorre somente no início de cada iteração. Uma hifa é, então, representada por uma sequência de cubos adjacentes preenchidos por biomassa (Figura 4.2), podendo esses cubos serem ligados por uma face, uma aresta ou um vértice.

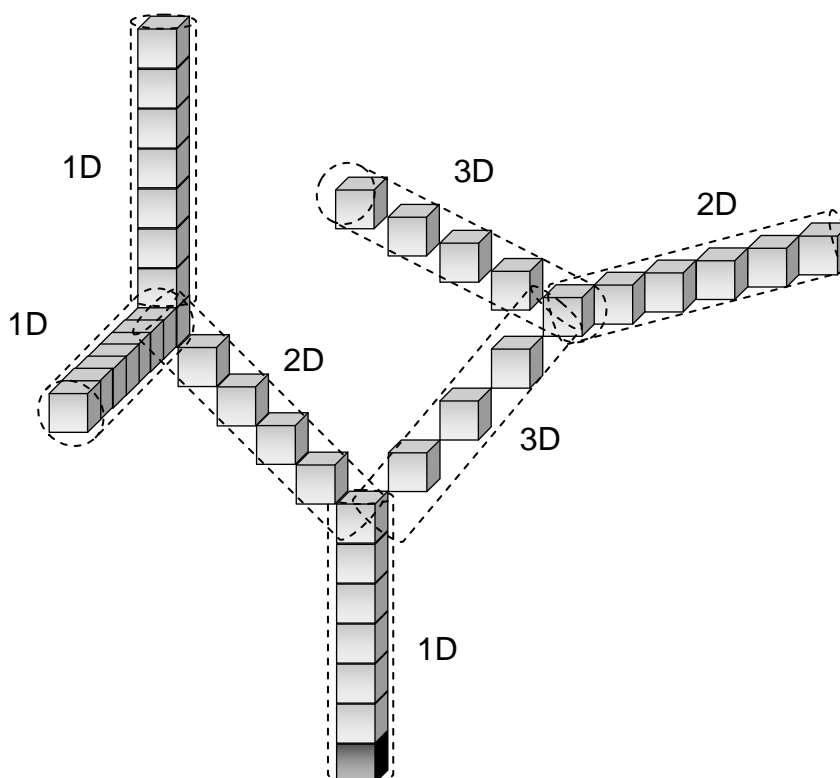


FIGURA 4.2 – EXEMPLO DE COMO A REDE DO MICÉLIO É ORIGINADA A PARTIR DE UM ESPORO

O cubo cinza escuro embaixo é o esporo e a rede do micélio é representada em um espaço tridimensional por cubos interconectados. Os cilindros pontilhados mostram como as junções entre vários pontos de ramificação representam segmentos de hifas. As legendas 1D, 2D e 3D indicam as diferentes orientações dos segmentos (ver o texto).

4.1.2 Escolha de Direções e Alongamento sem Restrições

No início de cada iteração, cada ponta de hifa que está presente no seu cubo particular no domínio precisa decidir sobre qual direção irá tomar para estender durante a próxima iteração. Esta decisão tem um elemento principal: cada cubo no domínio possui o que será chamado de “campo de probabilidades” ao redor dele. Este campo pode ser visualizado como um cubo virtual de 3 x 3 x 3 elementos, centrado no cubo ocupado pela ponta (semelhante àquele mostrado na direita da Figura 4.1). Cada um dos 26 cubos ao redor do cubo central possui uma probabilidade armazenada nele, representando a probabilidade de a ponta da hifa mover-se na direção daquele cubo durante a próxima iteração. Um número aleatório é gerado para determinar qual direção é escolhida através da qual a ponta sairá desse campo. O número aleatório é gerado por meio da sub-rotina RNUN da biblioteca IMSL do FORTRAN, semeado com a rotina RNSET (cuja “semente” é o horário indicado no relógio do sistema naquele momento). A sub-rotina RNUN gera números aleatórios com distribuição uniforme entre 0 e 1 e os armazena em uma matriz conforme especificado pelo usuário. Os números aleatórios são gerados no início da simulação e armazenados em uma matriz cujo tamanho é o produto do número máximo permitido de para o sistema (tip_{max}) e o número total de passos no tempo ($tstep_{max}$); ou seja, existe um número aleatório para cada ponta possível em cada um dos passos no tempo.

Na ausência de restrições no que diz respeito à direção a ser tomada, a soma das probabilidades dos 26 cubos no campo de probabilidades é igual à unidade. Entretanto, conforme serão explicados adiante, diferentes fatores podem fazer com que várias dessas 26 direções se tornem indisponíveis. Neste caso, a probabilidade daquela direção é zerada e redistribuída entre as direções permitidas.

Escolhida a direção a ser tomada, a ponta da hifa estende por certa distância. É importante notar que a direção de extensão pode ter três orientações básicas em relação aos eixos da malha de cubos, conforme mostrado na Figura 4.3.

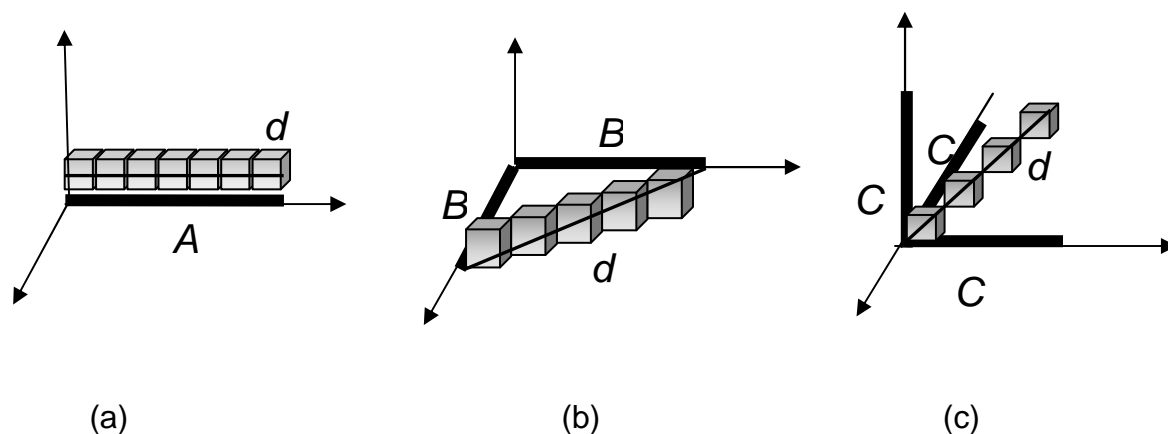


FIGURA 4.3 – EXTENSÃO DE UMA HIFA EM (a) 1D, (b) 2D OU (c) 3D

A explicação dos símbolos A , B , C e d é dada no texto

Quanto às direções de extensão da Figura 4.3, podem ser identificados três casos:

- (a) a direção de extensão pode ser paralela a um dos eixos e normal aos outros dois. Neste caso, os cubos sucessivos que formam um segmento de hifa serão unidos por faces dos cubos (Figura 4.3a);
- (b) a direção de extensão pode formar um ângulo de 45° com dois dos eixos e ser normal ao terceiro. Neste caso, os cubos sucessivos de um segmento de hifa serão unidos por arestas (Figura 4.3b);
- (c) a direção de extensão pode formar um ângulo de 45° com todos os três eixos da malha. Neste caso, os cubos sucessivos de um segmento de hifa serão unidos pelos vértices (Figura 4.3c).

O crescimento nessas três orientações será referenciado como movimento 1D, 2D ou 3D, respectivamente, uma vez que 1, 2 ou 3 das coordenadas cartesianas mudarão. A escolha de uma dessas orientações por uma hifa em particular será descrita na seção 4.1.3.

Durante uma iteração, uma hifa estendendo sem restrições deve percorrer essencialmente a mesma distância, independente da sua orientação. Para isso ocorrer, o número de cubos adicionados à hifa é diferente, dependendo da orientação de crescimento. Para movimento 1D é fácil verificar (Figura 4.3a) que a

distância percorrida é igual ao número de cubos (A) multiplicado pelo lado do cubo (L), ou seja:

$$d = AL \quad (4.1)$$

Para movimento 2D (Figura 4.3b), utilizando a regra de Pitágoras, o quadrado da distância total percorrida é igual à soma dos quadrados das distâncias percorridas em cada uma das dimensões. A distância percorrida em cada uma das dimensões é dada pelo número de cubos (B) multiplicado pelo lado L do cubo. Assim, têm-se:

$$d^2 = (BL)^2 + (BL)^2 \quad (4.2)$$

$$d = \sqrt{2B^2L^2} \quad (4.3)$$

$$d = BL\sqrt{2} \quad (4.4)$$

Da mesma forma, para o movimento 3D (Figura 4.3c), o quadrado da distância percorrida em três dimensões é igual à soma dos quadrados das distâncias percorridas em cada uma das dimensões (sendo cada uma destas distâncias igual ao número de cubos C multiplicado pelo lado L), ou seja:

$$d^2 = (CL)^2 + (CL)^2 + (CL)^2 \quad (4.5)$$

$$d = \sqrt{3C^2L^2} \quad (4.6)$$

$$d = CL\sqrt{3} \quad (4.7)$$

Portanto, é necessário identificar um conjunto de números inteiros que quase satisfaz às equações 4.1, 4.4 e 4.7, ou seja, que quase satisfaz a relação mostrada na equação 4.8:

$$d = AL = BL\sqrt{2} = CL\sqrt{3} \quad (4.8)$$

Os números $A = 7$, $B = 5$ e $C = 4$ são os menores números inteiros (em números de cubos) que aproximadamente satisfazem a equação 4.8, ou seja (equação 4.9):

$$7L \approx (5 \times \sqrt{2} \times L = 7,07L) \approx (4 \times \sqrt{3} \times L = 6,93L) \quad (4.9)$$

Com base nessas considerações, durante uma iteração, para o movimento em 1D, $7m$ cubos devem ser adicionados; para o movimento em 2D devem ser adicionados $5m$ cubos enquanto para o movimento em 3D são $4m$, onde m representa um número inteiro escolhido para dar uma distância entre ramificações semelhante à distância média no fungo.

4.1.3 Ramificação

A ramificação é uma característica essencial do crescimento de fungos filamentosos. Através dela, os fungos possuem a característica intrínseca de poder aumentar a biomassa exponencialmente (TRINCI, 1970). A ramificação em fungos filamentosos pode ser de dois tipos: apical ou lateral. No presente modelo, apenas a ramificação apical foi incorporada.

No modelo, a cada iteração ocorre a ramificação e uma ponta dará origem a duas hifas-filhas. Uma iteração, portanto, corresponde ao espaço de tempo entre duas ramificações da ponta. Tendo isto em vista, a questão central que deve ser resolvida quando a ramificação ocorrer é: “qual direção cada uma das hifas-filhas vai tomar?”.

Neste modelo, dois padrões diferentes de ramificação foram usados, os quais serão chamados de padrão V (que será aplicado para as hifas vegetativas) e padrão R (que será o padrão aplicado para hifas reprodutivas). Os detalhes sobre as hifas vegetativas e reprodutivas serão dados em seções posteriores. A partir deste momento, sempre que um parâmetro aparecer com o sobrescrito V, será referente

às hifas vegetativas. Quando o parâmetro aparecer com o sobrescrito R, referir-se-á a um parâmetro de hifa reprodutiva.

4.1.3.1 Padrão V de Ramificação

No padrão V a direção é escolhida primeiro para uma das hifas-filhas e, então, para a segunda. A direção a ser tomada pela primeira filha é determinada aleatoriamente, conforme descrito na seção 4.1.2, mas somente após a distribuição de probabilidades dentro do “campo” ser modificada para levar em consideração direções não disponíveis de movimentos. As direções de movimento podem não estar disponíveis por diferentes razões. O processo de definição de quais cubos serão “não disponíveis” será referido aqui como “bloqueio” e exemplos são mostrados na Figura 4.4.

Uma ponta-mãe que se encontra no centro do campo chegou lá através de um dos 26 cubos externos daquela caixa (na Figura 4.4, a ponta-mãe é representada pelo cubo cinza escuro ao centro e a hifa atrás da ponta pelo cubo cinza claro por onde a seta passa). Primeiramente, a hifa-mãe causa um impedimento estérico: é assumido que a hifa-filha não formará um ângulo agudo com a hifa mãe. Isso busca a incorporar o fenômeno do autotropismo negativo, em que as hifas procuram afastar-se uma das outras (HUTCHINSON *et al.*, 1980). Além disso, conforme medido por Yang *et al.* (1991), o ângulo de ramificação possui média de aproximadamente 90° (hifas-filhas perpendiculares às hifas-mãe), com desvio padrão de 30°. Este fenômeno é levado em consideração através do bloqueio de a hifa-filha sair da caixa através de um cubo adjacente àquele através do qual a ponta-mãe entrou na caixa. O bloqueio também vale para o cubo através do qual a ponta entrou porque ele está ocupado pela hifa-mãe. Três diferentes modos de bloqueio devem ser considerados, já que a geometria é diferente quando a hifa-mãe está se movendo em 1D, 2D ou 3D (Figura 4.4).

Escolhida a direção que a primeira hifa-filha vai tomar, esta também causa um impedimento estérico para a segunda hifa-filha. É assumido que a segunda hifa filha não vai tomar direções que formem ângulos muito agudos nem com a hifa-mãe e nem com a primeira hifa-filha. O modo de bloqueio é semelhante àquele aplicado

no caso da hifa-mãe (Figura 4.4) com a diferença de que, para a segunda hifa-filha, o cubo em cinza claro representa a direção através da qual a primeira hifa-filha saiu da caixa. Vale salientar que os cubos bloqueados devido à chegada da hifa-mãe permanecem também bloqueados para a saída da segunda hifa-filha.

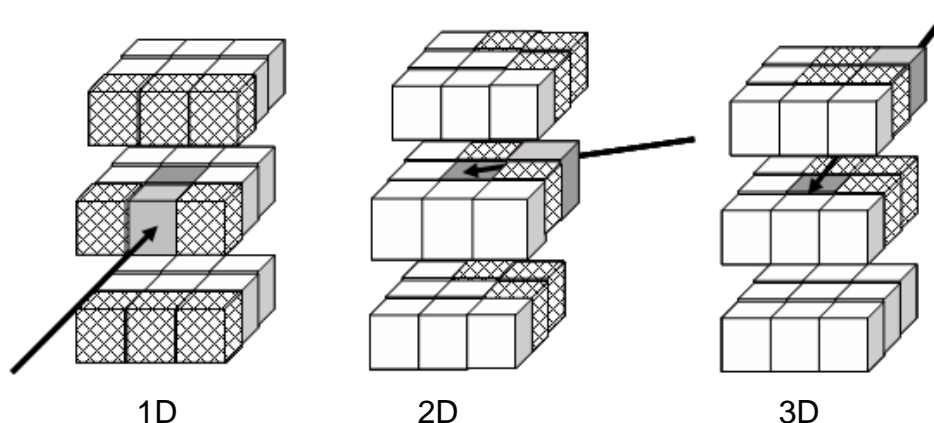


FIGURA 4.4 – MODOS DE BLOQUEIO RELACIONADOS À LOCALIZAÇÃO DA HIFA-MÃE

A ponta-mãe está no cubo central (cinza escuro ao centro) e atingiu este cubo passando através de outro cubo e deixando o rastro (cinza claro). Três diferentes formas de bloqueio são utilizadas, dependendo se a ponta-mãe atingiu o centro enquanto se movia em 1D, 2D ou 3D. Os cubos hachurados representam os cubos então bloqueados.

Em uma iteração em particular, os “bloqueios” que existem naquele instante são levados em consideração pela mudança da probabilidade de tomar a direção de um cubo bloqueado, ou seja, a probabilidade armazenada dentro daquele cubo no campo de probabilidades é levada à zero. Para escolher uma direção para o movimento da ponta, as probabilidades nos cubos restantes (não bloqueados) são normalizadas (por divisão de cada probabilidade pela soma de todas as probabilidades restantes).

Os bloqueios são temporários. Para cada iteração sucessiva, o processo de bloqueio é refeito para cada ponta do sistema, com a distribuição das probabilidades no campo de probabilidades de volta à distribuição original de probabilidades.

As probabilidades de uma hifa tomar uma direção para cima, no mesmo nível ou para baixo são diferentes, denotadas por P_+ , P_0 e P_- , respectivamente. A regra utilizada neste caso foi que estas probabilidades dependem da altura. Quanto mais alta a hifa se encontra, maiores são as chances de ela voltar a um plano inferior, sendo esta probabilidade determinada pela equação 4.10:

$$P_- = \frac{z}{z_{\max}} \quad (4.10)$$

onde z é a variável que representa a altura (em número de cubos) da ponta-mãe e z_{\max} o número máximo de cubos no sistema.

As chances de uma hifa-filha tomar uma direção no próprio plano ou no plano imediatamente superior (para cima) dependem do parâmetro α , cujo valor é variável entre 0 e 1 e definido ao início de cada simulação. A probabilidade de ramificar no próprio plano é dada então pela equação 4.11:

$$P_0 = \alpha \left(1 - \frac{z}{z_{\max}} \right) \quad (4.11)$$

A probabilidade, então, de a hifa tomar a direção para cima é dada pela probabilidade restante, ou seja (equação 4.12):

$$P_+ = (1 - \alpha) \left(1 - \frac{z}{z_{\max}} \right) \quad (4.12)$$

As probabilidades P_- , P_0 e P_+ , são inicialmente distribuídas uniformemente nos três níveis do campo de probabilidades. Depois da aplicação dos bloqueios, as probabilidades são normalizadas, como explicado anteriormente nesta mesma seção. No próximo passo no tempo, para cada ponta de hifa vegetativa, de acordo com a altura, as probabilidades são novamente distribuídas no campo e os bloqueios se repetem conforme o novo ambiente.

4.1.3.2 Padrão R de Ramificação

No padrão R não há os bloqueios que ocorrem no padrão V. As hifas-filhas sempre crescerão no sentido positivo do eixo z (ou seja, estando uma ponta em certa altura em z as pontas-filhas sempre tomarão uma direção rumo a $z+1$), em

posições opostas, conforme a Figura 4.5. A escolha de qual das quatro possibilidades é feita através de um gerador de números aleatórios utilizando também a sub-rotina RNUN da biblioteca IMSL do FORTRAN, sendo que qualquer uma das quatro possibilidades representadas na Figura 4.5 possui a mesma probabilidade de ocorrer.

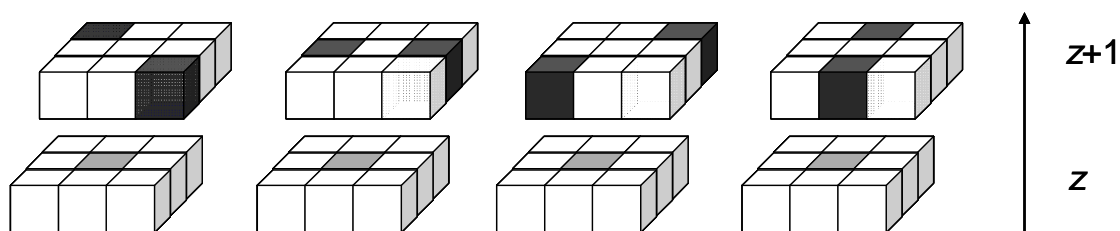


FIGURA 4.5 – POSSIBILIDADES DE RAMIFICAÇÃO NO PADRÃO R

A ponta-mãe está representada pelo cubo cinza claro na posição z e as pontas-filhas estão em cinza escuro em $z+1$.

4.1.4 Diferenciação

O processo de diferenciação refere-se à mudança de um organismo de um estágio para outro. Estas mudanças podem ser fisiológicas ou morfológicas. No caso deste modelo, a diferenciação refere-se à mudança das hifas do tipo vegetativas para hifas do tipo reprodutivas que, no contexto do modelo, envolve a mudança do padrão V de ramificação para o padrão R de ramificação.

Conforme relatado por Prosser (1995), nos micélios diferenciados as ramificações ocorrem em ângulos menores do que 90° . Esta característica foi incorporada ao modelo no padrão R de ramificação através de ângulos agudos entre as hifas-filhas, seguindo essencialmente na mesma direção, para cima, como a hifa mãe (veja seção 4.1.3.2). Além disso, Prosser (1995) relata que há um aumento na velocidade de extensão e no diâmetro das hifas. Neste modelo, somente o aumento na velocidade de extensão é levado em conta, mas não o aumento do diâmetro. As hifas vegetativas possuem uma velocidade de extensão que será chamada de v_{ext}^V , ao passo que as hifas reprodutivas possuem uma velocidade que será chamada v_{ext}^R .

Para o fungo *Neurospora crassa* crescendo em colônia sobre meio sólido, por exemplo, a diferenciação começa em torno de 22 h (McLEAN e PROSSER², 1987, citado por PROSSER, 1995). No modelo, esta mudança é pontual, e ocorre em um momento que será chamado de tempo de diferenciação – t_d . Em outras palavras, no começo da simulação todas as hifas são do tipo vegetativo, até o tempo atingir t_d . A partir de t_d , algumas hifas tornam-se reprodutivas, de acordo com o valor estabelecido para a porcentagem de hifas viáveis que se tornam reprodutivas (parâmetro $P_{V \rightarrow R}$, que será explicado na seção 4.1.8). No momento t_d , as hifas vegetativas param de crescer, e somente aquelas que passaram a ser reprodutivas irão alongar.

4.1.5 Germinação

A germinação é o primeiro processo que ocorre após a deposição dos esporos. Ela ocorrerá ou não dependendo das condições de temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e atividade de água. Neste modelo, a germinação foi incorporada através de uma porcentagem de germinação, que será chamada de “G”. A porcentagem de germinação foi estudada para o fungo *Rhizopus oligosporus* por Medwid e Grant (1984) em diferentes condições de pH e nutrientes, na tentativa de otimizar o processo. Uma germinação de no máximo 60% foi obtida. No modelo, a porcentagem de germinação foi aplicada da seguinte maneira: a cada esporo foi aplicada uma probabilidade de germinar igual a “G”. Um número aleatório, gerado em uma distribuição uniforme entre 0 e 1, era comparado a “G” para cada um dos esporos. Se este número era menor do que G, então o esporo germinava. Caso contrário, o esporo permanecia no sistema, mas não germinava.

² McLEAN, K.M.; PROSSER, J.I. Developments of vegetative mycelium during colony growth of *Neurospora crassa*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.88, p.489-495, 1987.

4.1.6 Movimentos não Permitidos

Durante a extensão da hifa (adição de cubos durante o passo no tempo), é necessário checar se a ponta da hifa tenta fazer algum dos três tipos de movimento não permitidos:

- (1) não é permitido que pontas de hifa saiam do sistema. Caso alguma ponta chegue a um limite do sistema virtual em algum passo no tempo, então ela para imediatamente. No começo do próximo passo no tempo, se a ponta ainda for viável (conceito que será discutido posteriormente na seção 4.1.8), é permitido que a ponta tome uma nova direção de acordo com as regras de ramificação e extensão descritas anteriormente. Se esta nova direção está dentro dos limites do sistema, então é permitido que a ponta se alongue e a hifa cresça. Caso contrário, a ponta perde novamente a vez de estender;
- (2) as pontas não podem entrar em uma célula já ocupada por biomassa. Caso a ponta de hifa atinja um cubo já ocupado por uma hifa enquanto alongando em um passo no tempo, então ela para imediatamente. No início do próximo passo no tempo, como no item anterior, se a ponta ainda for viável, é permitido que uma nova direção seja escolhida. Caso esta nova direção não esteja impedida por biomassa já existente, então a ponta pode estender. Caso contrário, a ponta perde novamente a vez;
- (3) Duas pontas de hifa não podem entrar em uma mesma célula vazia no mesmo momento. Se as duas pontas de hifa tentam fazer isto, então ambas param imediatamente. No início do próximo passo, elas podem se redirecionar e, se o movimento não for impedido novamente por alguma razão, então cada ponta vai estender.

A cada vez que um destes movimentos não permitidos ocorre, o histórico acumulado de movimentos não permitidos (mov_{np}) aumenta em um. Este histórico é armazenado para cada ponta de hifa e aumenta a cada movimento não permitido

realizado, mesmo que estes movimentos não permitidos ocorram em espaços bem separados no tempo.

A existência do parâmetro mov_{np} poderia ser justificada pelo fato de que aproximações de hifas podem reduzir a concentração de oxigênio ao redor da hifa a um nível baixo o suficiente para reduzir a velocidade de extensão de hifas que se aproximam, o que pode tanto causar uma parada no crescimento ou uma mudança de direção (PROSSER, 1995). Esta conclusão não foi feita especificamente para as hifas aéreas (que, além disso, crescem com abundância de ar ao redor), mas pode sugerir um mecanismo semelhante (a liberação de algum metabólito, por exemplo). A atividade respiratória do lado da hifa em que outra hifa se aproxima será reduzida e as vesículas e atividade de síntese de precursores de parede se concentrará no lado oposto. Isto ocasiona um aumento na capacidade de extensão da parede celular nesta região e leva à extensão através de zonas com maior concentração de oxigênio, e distante da hifa vizinha (PROSSER, 1990).

O número máximo de movimentos não permitidos é um parâmetro da simulação, que será representado por mov_{npmax}^V para hifas vegetativas e mov_{npmax}^R para as hifas reprodutivas. Quando uma ponta atinge este valor, aquela ponta torna-se inativa e não mais alongará ou ramificará nos passos futuros, ainda que continue presente no modelo.

4.1.7 Outras Suposições do Modelo

Algumas suposições do modelo serão descritas a seguir:

- a biomassa fúngica é imóvel: uma vez que um espaço é ocupado por biomassa de certa hifa, ele permanecerá ocupado até o fim da simulação. O único movimento é o das pontas. Conforme Prosser (1990), qualquer mecanismo de resposta a estímulos deve residir na zona de extensão (que, no caso deste modelo, é a região entre a última ramificação e a ponta). Esta é a região onde material novo é incorporado e é relativamente elástica, enquanto que o material que compõe a parede da hifa atrás da zona de extensão é rígido e incapaz de mudar de direção;

- o crescimento ocorre em um espaço fechado: as únicas pontas do sistema são aquelas geradas pelo processo de ramificação. Não há a possibilidade de pontas entrarem vindas “de fora” do sistema;
- não há limitações nutricionais: em outras palavras, o sistema é puramente físico, não levando em conta translocação de matéria dentro da hifa. O crescimento é função da combinação de direção de alongamento e disponibilidade de espaço.

4.1.8 Calibração do Modelo e Determinação de Parâmetros

Este modelo foi desenvolvido visando o ajuste aos dados experimentais obtidos por Nopharatana (1999) para o crescimento de hifas aéreas de *Rhizopus oligosporus* sobre PDA (dados mostrados na seção 2.3.1, Figura 2.9b).

A área transversal cilíndrica da hifa fúngica foi medida por Nopharatana (1999) como sendo próxima de $100 \mu\text{m}^2$, equivalente a um raio de $5,64 \mu\text{m}$. Neste modelo, como a área transversal é aproximada por uma face do cubo, o lado L do cubo foi definido como sendo $10 \mu\text{m}$. O espaço virtual de crescimento possui uma área de 1 mm^2 (100 cubos x 100 cubos) e uma altura de 5 mm (sendo z_{max} então igual a 500 cubos), totalizando um volume de 5 mm^3 .

De acordo com Nopharatana (1999), a densidade de inoculação superficial de esporos (DI) estaria em torno de $400 \text{ esporos mm}^{-2}$. Portanto, ao se iniciar uma rodada do modelo, esses 400 esporos (cada um representando uma ponta nova de hifa) são distribuídos uniformemente entre os 10000 cubos possíveis em 1 mm^2 de superfície. Os esporos poderão germinar ou não, com uma probabilidade de germinação G de 50%, a princípio, que será posteriormente variada para avaliar o efeito dela sobre os perfis simulados.

O programa foi calibrado para efetuar 25 passos de tempo (ou seja, 25 intervalos entre ramificações). Em outras palavras, $t_{\text{step}_{\text{max}}} = 25$. O tempo total (t_{total}) de simulação é igual ao número de passos no tempo multiplicado pela duração de um passo, a qual é igual ao tempo entre ramificações (t_r), ou seja:

$$t_{\text{total}} = t_{\text{step}_{\text{max}}} t_r \quad (4.13)$$

Para as hifas vegetativas, o conjunto de números inteiros escolhidos para a equação 4.8 foi $A = 14$, $B = 10$ e $C = 8$ ($m = 2$), o que equivale a dizer que a distância percorrida em um t_r é de aproximadamente 140 μm . Essa distância média é obtida dividindo o comprimento total do micélio pelo número de pontas e é chamada de unidade de crescimento da hifa (*hyphal growth unit* – HGU) (TRINCI, 1974). O valor de 14 cubos, para movimento em 1D, resulta em uma distância de 140 μm ($d \times L = 14 \times 10 \mu\text{m}$). Isto é compatível com o valor médio de HGU de hifas vegetativas obtido por Trinci (1974) para *Geotrichum candidum* e *Aspergillus nidulans*, cujo valor médio, após estabilização do cultivo, foi de 160 μm .

No caso das hifas reprodutivas, foi assumido que a velocidade de extensão das hifas reprodutivas é o dobro da das hifas vegetativas, ou seja:

$$v_{\text{ext}}^R = 2 v_{\text{ext}}^V \quad (4.14)$$

Considerando um tempo entre ramificações médio de 1,6 h (tempo estimado por tentativa e erro para obter um ajuste visual próximo aos dados experimentais), v_{ext}^V é de 87,5 $\mu\text{m h}^{-1}$, enquanto v_{ext}^R é de 175 $\mu\text{m h}^{-1}$. Estes valores estão dentro das faixas de velocidade de extensão para hifas jovens (49 – 325 $\mu\text{m h}^{-1}$) e hifas maduras (127 – 894 $\mu\text{m h}^{-1}$) (TRINCI, 1974), as quais são bastante variáveis, dependendo da espécie. Além disto, como relatado anteriormente, hifas diferenciadas (que é o caso das hifas reprodutivas) apresentam um aumento na velocidade (PROSSER, 1995).

O número máximo de pontas admitidas no sistema (tip_{max}) é de 180000. Este número máximo de pontas foi escolhido de maneira a ser grande o suficiente para que não fosse atingido em nenhuma simulação para as 40 h simuladas.

A densidade da hifa, conforme utilizado por Nopharatana (1999), é próxima da densidade da água ($\approx 1,0 \text{ g cm}^{-3}$). Considerando que o fungo possui 90% de umidade (e 10% de biomassa seca), a densidade aproximada de biomassa seca (ρ_{hifa}) do fungo é de 100 mg cm^{-3} (NOPHARATANA, 1999). Essa é a densidade armazenada em um cubo quando a hifa está se movendo em 1D. Quando a hifa cresce em 2D ou 3D, o comprimento acrescentado é o mesmo que cresce em 1D. Entretanto, devido à geometria, este comprimento é representado por um número diferente de cubos. Quando a hifa cresce em 1D, ela atravessa um espaço de uma aresta para a outra na mesma face, percorrendo, portanto, uma distância igual a L

por cada cubo adicionado. Já quando a hifa cresce em 2D, ela atravessa de uma aresta em um face para outra aresta em outra face no cubo, percorrendo, desta maneira, uma distância igual a $L\sqrt{2}$. Em 3D, a hifa atravessa de um vértice para o vértice oposto no cubo, sendo, desta maneira, que a distância percorrida é igual a $L\sqrt{3}$. Assim, o cilindro do tubo da hifa está orientado diferentemente em cada um dos três casos. Por isso, quando a hifa se move em 2D ou 3D, a densidade armazenada em cada cubo é proporcionalmente aumentada (pelos fatores $\sqrt{2}$ e $\sqrt{3}$, respectivamente) de modo que a massa efetivamente adicionada em um passo de tempo entre ramificações seja a mesma, independente se a hifa se move em uma, duas ou três dimensões.

No momento da diferenciação (t_d), o seguinte conjunto de regras foi usado para determinar se uma hifa vegetativa estaria apta a se tornar reprodutiva:

- (1) foi considerado que somente a metade mais nova das hifas tivesse o potencial para se diferenciar ($P_{V \rightarrow R}$ igual a 50%). Isto quer dizer que somente aquelas pontas “nascidas” por último estariam aptas para se diferenciar;
- (2) destas hifas, foram consideradas somente aquelas que estavam crescendo para cima no instante da diferenciação (apontadas para a direção positiva de z);
- (3) das hifas que passaram nos dois testes acima, a diferenciação (troca de padrão V de extensão e ramificação para padrão R de extensão e ramificação) somente foi aplicado àquelas que não tinham realizados movimentos não permitidos até então.

Além disso, as hifas reprodutivas poderão realizar no máximo um movimento não permitido, ou seja, mov_{npmax}^R tem um valor igual a 1. Para as hifas vegetativas, esse valor foi calibrado como sendo mov_{npmax}^V igual a 2.

Nos resultados que serão mostrados adiante, o valor de α (relacionado à distribuição de probabilidades de direções de ramificação das hifas vegetativas, seção 4.1.3.1) foi escolhido como sendo de 5%.

Na Figura 4.6 é mostrado um fluxograma que resume os eventos e as decisões que ocorrem no modelo.

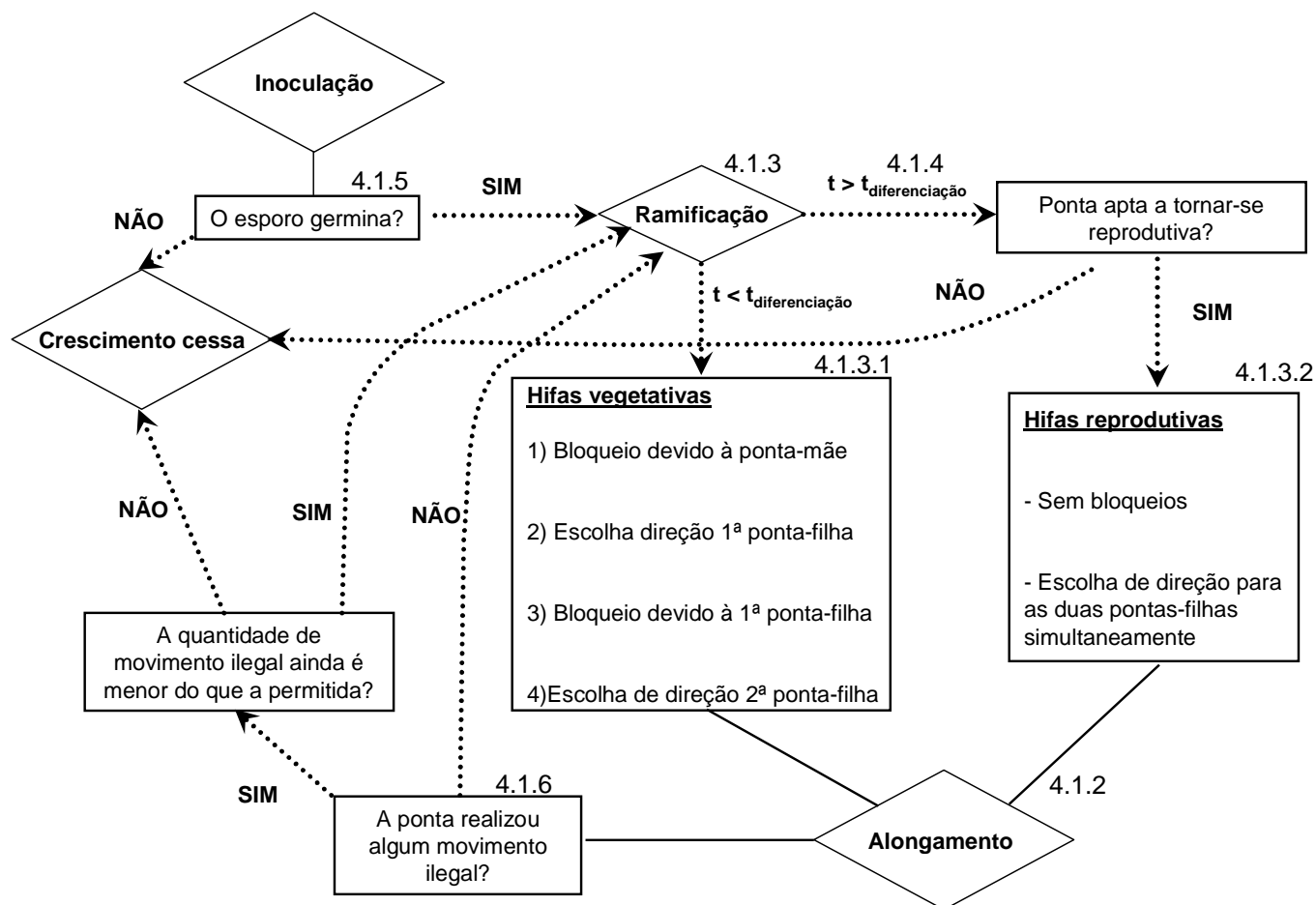


FIGURA 4.6 – FLUXOGRAMA REPRESENTATIVO DOS EVENTOS E DAS DECISÕES DO MODELO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS

O número ao lado de cada evento representa a seção onde mais detalhes são descritos.

Para todos os resultados mostrados na sequência, foram feitas cinco simulações em cada condição e a média das simulações é mostrada. Além disso, a fim de suavizar eventuais ruídos dos resultados, apesar de a densidade de biomassa para cada um dos 500 cubos em z ter sido quantificada, nos gráficos é mostrada a média móvel em cada ponto com um período de cinco (ou seja, média do resultado e das duas alturas anteriores e posteriores). Na primeira posição da superfície foi feita a média móvel com o resultado e as duas alturas posteriores, visto que as duas anteriores não estariam disponíveis. Para a segunda posição, foi feita a média do resultado, uma altura anterior e duas posteriores. Para as duas últimas posições, a média foi feita de maneira análoga.

Durante o desenvolvimento do modelo, vários parâmetros foram estimados e os seus valores estão descritos nas Tabelas 4.1 e 4.2. Os parâmetros foram divididos entre as Tabelas do seguinte modo: a Tabela 4.1 traz parâmetros que são próprios do sistema, e que não serão variados nas seções posteriores de resultados. Por isso, esses parâmetros serão chamados de parâmetros “fixos” do modelo. A Tabela 4.2 traz os parâmetros que foram estimados de modo a se obter, por tentativa e erro, o melhor ajuste visual do modelo aos dados de Nopharatana (1999). Esses parâmetros serão chamados de parâmetros “variáveis” do modelo e a sensibilidade do modelo a alguns deles será avaliada posteriormente.

O modelo foi codificado na linguagem FORTRAN 90 e compilado utilizando o *software* Compaq Visual Fortran Professional Edition 6.5.0. Os resultados mostrados na próxima seção foram obtidos em uma máquina com processador Intel® Celeron® M440 (1,86 GHz) com 1 GB de RAM e utilizando o sistema operacional *Windows Vista*TM.

TABELA 4.1 – PARÂMETROS FIXOS DO MODELO DOS AUTÔMATOS CELULARES

Parâmetro	Descrição	Valor	Unidade	Referência
DI	Densidade de inoculação	400	esporos mm^{-2}	Nopharatana (1999)
L	Lado do cubo	10	μm	Escolhido
tip_{max}	Número máximo de pontas permitidas no sistema	180000	pontas	Escolhido
t_r	Tempo entre ramificações (duração de cada passo)	1,6	h	Escolhido
$tstep_{max}$	Número total de passos no tempo	25	passos	Escolhido
v_{ext}^R	Velocidade de extensão das hifas reprodutivas	175	$\mu\text{m h}^{-1}$	Trinci (1974)
v_{ext}^V	Velocidade de extensão das hifas vegetativas	87,5	$\mu\text{m h}^{-1}$	Trinci (1974)
Z_{max}	Máxima altura, em número de cubos, atingida por uma ponta dentro do tempo simulado	500	cubos	Escolhida
ρ_{hifa}	Densidade de biomassa seca da hifa	100	mg cm^{-3}	Nopharatana (1999)

TABELA 4.2 – PARÂMETROS VARIÁVEIS DO MODELO DOS AUTÔMATOS CELULARES E SEUS VALORES ESTIMADOS

Parâmetro	Descrição	Valor	Unidade
G	Probabilidade de germinação	50	%
mov_{npmax}^R	Número máximo de movimentos não permitidos acumulados para hifas reprodutivas	1	Adimensional
mov_{npmax}^V	Número máximo de movimentos não permitidos acumulados para hifas vegetativas	2	Adimensional
$P_{V \rightarrow R}$	Porcentagem mais nova das hifas vegetativas viáveis que se tornam hifas reprodutivas	50	%
t_d	Tempo a partir do qual as hifas vegetativas tornam-se reprodutivas	19,2*	h
α	Parâmetro auxiliar da distribuição de probabilidade nos cubos vizinhos para hifas vegetativas	5	%

* passo 12

4.2 RESULTADOS

As seções que seguem estão organizadas da seguinte maneira: primeiramente, é mostrado o resultado do ajuste do modelo aos dados experimentais com base nas regras e parâmetros descritos ao longo da seção 4.1. Posteriormente, será feita uma análise de sensibilidade do modelo, onde alguns parâmetros serão variados e será analisada a influência deles sobre o perfil predito. Com esta análise, pretende-se demonstrar a potencialidade do modelo em descrever um perfil complexo com algumas regras simples e também mostrar a possibilidade de gerar perfis diferentes pela alteração de poucas regras. As regras propostas na seção 4.1 foram impostas para o crescimento específico das hifas aéreas de *Rhizopus oligosporus* crescendo sobre o meio de cultivo PDA.

A estratégia utilizada no modelo desenvolvido será comparada principalmente à de Nopharatana (1999), já que foi utilizado o mesmo sistema experimental.

4.2.1 Ajuste do Modelo aos Dados Experimentais

O crescimento das hifas aéreas foi modelado conforme as regras e equações descritas na seção 4.1 deste capítulo. Os parâmetros mostrados nas Tabelas 4.1 e 4.2 foram utilizados para simular o sistema e ajustar o modelo aos dados experimentais do crescimento das hifas aéreas obtidos por Nopharatana (1999). O resultado da simulação, bem como os dados experimentais, é mostrado na Figura 4.7.

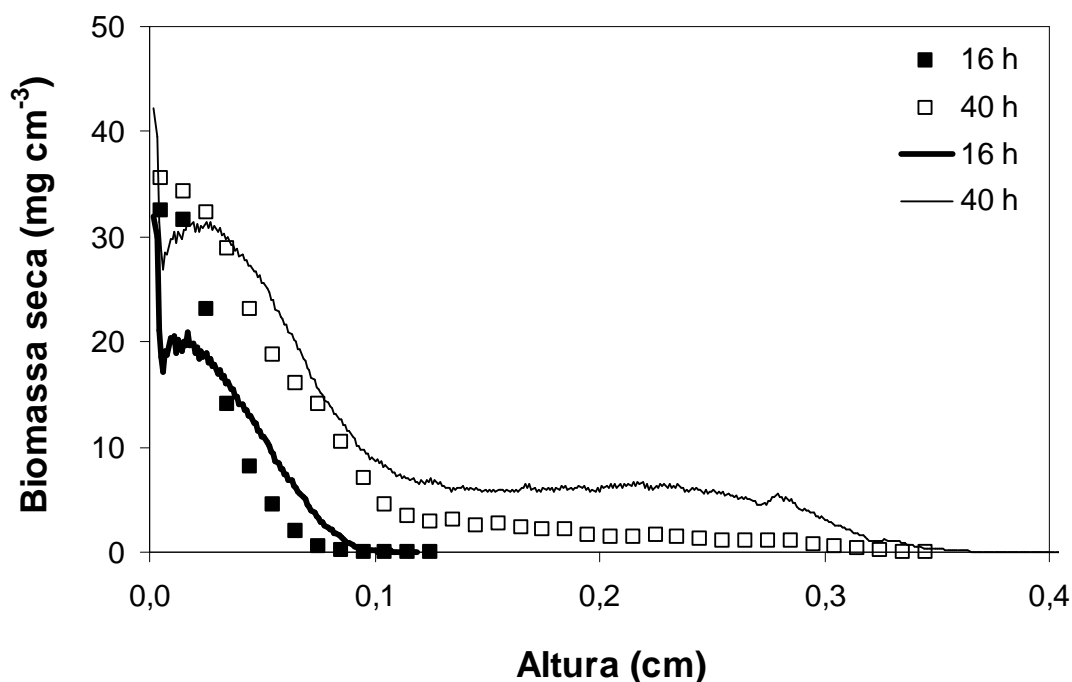


FIGURA 4.7 – AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) PARA O CRESCIMENTO DA BIOMASSA AÉREA DO FUNGO *Rhizopus oligosporus* SOBRE PDA

As linhas representam a média de 5 simulações.

O modelo descreveu vários aspectos dos perfis experimentais, ainda que o ajuste não seja perfeito (Figura 4.7). Para o ajuste em 16 h, o modelo previu um perfil de densidade de biomassa iniciando em torno de 20 mg cm^{-3} (após uma oscilação inicial) e caindo gradativa e suavemente até alturas um pouco maiores do que 0,1 cm. Ainda que para alturas menores do que 0,03 cm a densidade prevista seja menor do que a densidade experimental, a partir dessa altura o perfil simulado assemelha-se ao experimental.

Para o ajuste em 40 h, o perfil predito é semelhante ao experimental de densidade de biomassa seca em função da altura. As previsões do modelo concordam muito bem com os dados até a altura de 0,08 cm. A partir daí, o perfil modelado é bastante semelhante, mas a densidade é maior do que a densidade experimental atingida.

Além disto, a altura máxima atingida com a simulação (0,37 cm) está de acordo com a máxima altura obtida experimentalmente (próxima de 0,35 cm). Em 40 h, bem próximo à superfície, a biomassa ultrapassou o valor máximo de

$40 \pm 5 \text{ mg cm}^{-3}$ obtido experimentalmente por Nopharatana (1999). A partir deste ponto, entretanto, a biomassa caiu significativamente, essencialmente seguindo a tendência experimental.

O ajuste obtido através do modelo dos autômatos celulares é mais próximo do perfil experimental do que o ajuste conseguido pelo uso de um modelo contínuo por Nopharatana (1999). Com um modelo contínuo, o perfil previsto pelos autores concordou com o perfil experimental para 16 h. Para 40 h, entretanto, o perfil foi significativamente diferente, já que foi atingido um patamar com um máximo de biomassa (em torno de 40 mg cm^{-3}) até uma altura em torno de 0,06 cm e depois uma queda abrupta de densidade, a qual atingiu o valor de zero em uma altura menor do que 0,15 cm (vide Figura 2.9b, da seção 2.3.1).

4.2.2 Análise de Sensibilidade

No texto que segue, o ajuste obtido com o conjunto de parâmetros contido nas Tabelas 4.1 e 4.2 será chamado de resultado “padrão”. O objetivo do desenvolvimento do modelo não é necessariamente ter um ajuste perfeito, mas sim avaliar a aplicabilidade da abordagem de CA de modelagem e levantar questões que direcionem pesquisas futuras. Muitas questões envolvendo o desenvolvimento de hifas fúngicas, como o local onde ocorre a ramificação e a integração da ramificação com a divisão nuclear, crescimento celular e desenvolvimento da colônia, ainda permanecem sem resposta (HARRIS, 2008).

4.2.2.1 Biomassa Vegetativa x Biomassa Reprodutiva

Uma das questões centrais na proposição do modelo, conforme havia sido sugerido por Nopharatana (1999), foi a incorporação da biomassa reprodutiva, com características de crescimento diferentes da biomassa vegetativa. Para mostrar a necessidade de ter dois tipos de biomassa com as regras aqui utilizadas, na Figura 4.8a é mostrada uma simulação do modelo apenas com o desenvolvimento das hifas vegetativas durante as 40 h simuladas. Na Figura 4.8b é mostrado o oposto, ou seja, o desenvolvimento apenas da biomassa reprodutiva de 0 a 40 h. Os parâmetros utilizados para as simulações da Figura 4.8 foram os mesmos das Tabelas 4.1 e 4.2, dispensando a necessidade dos parâmetros $P_{V \rightarrow R}$ e t_d .

A importância da proposição de regras diferentes para cada tipo de biomassa para o ajuste do modelo aos dados experimentais fica clara na Figura 4.8. No caso da Figura 4.8a, para 16 h, as previsões são essencialmente idênticas às aquelas obtidas com as regras da simulação padrão. Isto ocorre porque a diferenciação acontece somente em 19,2 h na simulação padrão. Como descrito para o resultado padrão, as regras para descrever o crescimento das hifas vegetativas ocasionaram uma descrição razoável dos dados neste caso.

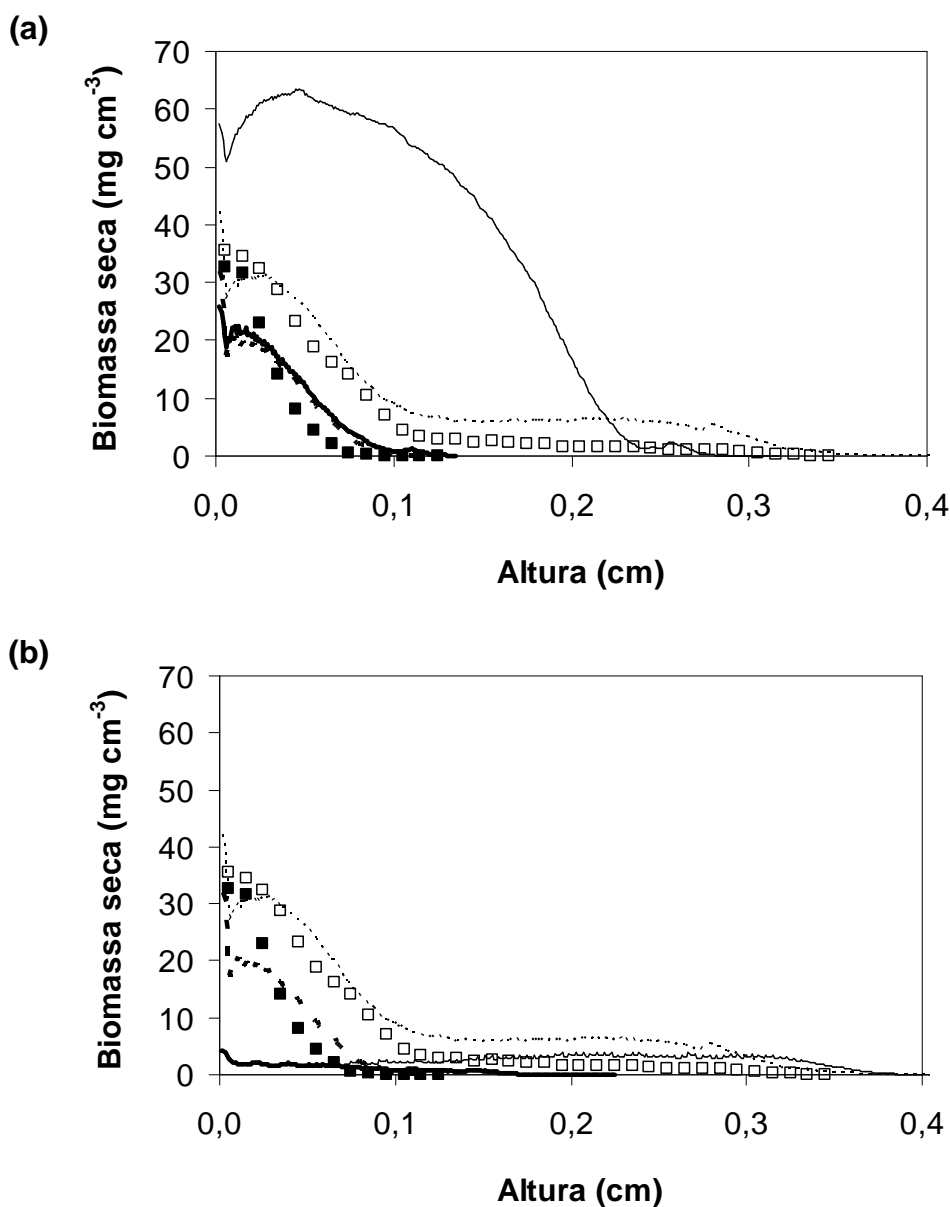


FIGURA 4.8 – AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) PARA O CRESCIMENTO DA BIOMASSA AÉREA COM APENAS UM TIPO DE BIOMASSA

(■) dados experimentais de 16 h

(□) dados experimentais de 40 h

(—) simulação padrão para 16 h

(---) simulação padrão para 40 h

(a) Apenas biomassa vegetativa em (—) 16 h e (---) 40 h

(b) Apenas biomassa reprodutiva em (—) 16 h e (---) 40 h

Todas as linhas representam a média de cinco simulações.

Quando os perfis são simulados com as regras estabelecidas para apenas a biomassa reprodutiva (Figura 4.8b), fica claro que o modelo seria incapaz de descrever os dados experimentais para 16 h. Isso ocorre porque a biomassa reprodutiva percorre o dobro de distância em um intervalo entre ramificações, e não

“volta” para alturas menores. Esta regra faz com que as hifas reprodutivas dêem uma biomassa esparsa que alcança alturas grandes relativamente rapidamente.

Para as simulações em 40 h, fica ainda mais evidente a importância de existir um tempo de diferenciação a partir do qual as regras mudam. Com o desenvolvimento apenas de hifas vegetativas, haveria um crescimento bastante denso em alturas baixas e intermediárias, com uma densidade de biomassa maior do que 40 mg cm^{-3} (chegando a valores maiores do que 60 mg cm^{-3}) em alturas entre 0 e 0,15 cm. Este perfil ocorre porque as hifas vegetativas se ramificam mais dentro de uma mesma faixa de altura do que as hifas reprodutivas e têm a possibilidade de voltar. Por outro lado, as hifas reprodutivas são mais velozes e crescem de maneira mais “linear”, como descrito anteriormente. Com apenas hifas reprodutivas, em 40 h, a simulação descreve os dados experimentais para alturas maiores do que 0,1 cm, mas fica bem distante em alturas menores do que este valor.

Com isto, fica claro que o desenvolvimento de hifas reprodutivas, menos ramificadas e mais velozes, é importante para a descrição dos dados experimentais para alturas maiores do que 0,1 cm, enquanto as hifas vegetativas são importantes para a descrição dos dados em alturas menores do que este valor.

4.2.2.2 Influência de mov_{npmax}^V

Uma outra regra que afeta significativamente o modelo diz respeito ao número máximo de movimentos não permitidos para as hifas vegetativas (mov_{npmax}^V). Na Figura 4.9 é mostrado o gráfico quando este parâmetro é variado em uma unidade para mais ou para menos em relação ao estipulado na Tabela 4.2.

Para 16 h, diminuindo ou aumentando o valor de mov_{npmax}^V o perfil é significativamente alterado. Com mov_{npmax}^V igual a 3, a descrição dos dados para 16 h é razoável, e até mais semelhante aos dados experimentais do que a simulação padrão. Para o tempo maior (40 h), o perfil é bastante semelhante ao perfil dos dados experimentais. Entretanto, a densidade máxima atingida é bastante elevada, chegando a valores de até a 70 mg cm^{-3} . Para as duas simulações com mov_{npmax}^V igual a 1 (Figura 4.9a) o ajuste fica visivelmente pior do que o da simulação padrão, que é com mov_{npmax}^V igual a 2.

Mesmo que na situação real a regra não seja exatamente isto, estes resultados sugerem que a “regra” para fazer com que as pontas parem de alongar tem muita influência sobre o perfil de densidade de biomassa em pequenas alturas. Além disso, no modelo, seria possível também ter um bom ajuste com mov_{npmax}^V igual a 3, mesmo para 40 h, se o tempo de diferenciação for diminuído. Isto porque, se o tempo de diferenciação fosse menor, as hifas reprodutivas começariam a crescer antes e, então, a densidade de biomassa para uma altura de até 0,1 cm não aumentaria significativamente em relação àquela do perfil de 16 h.

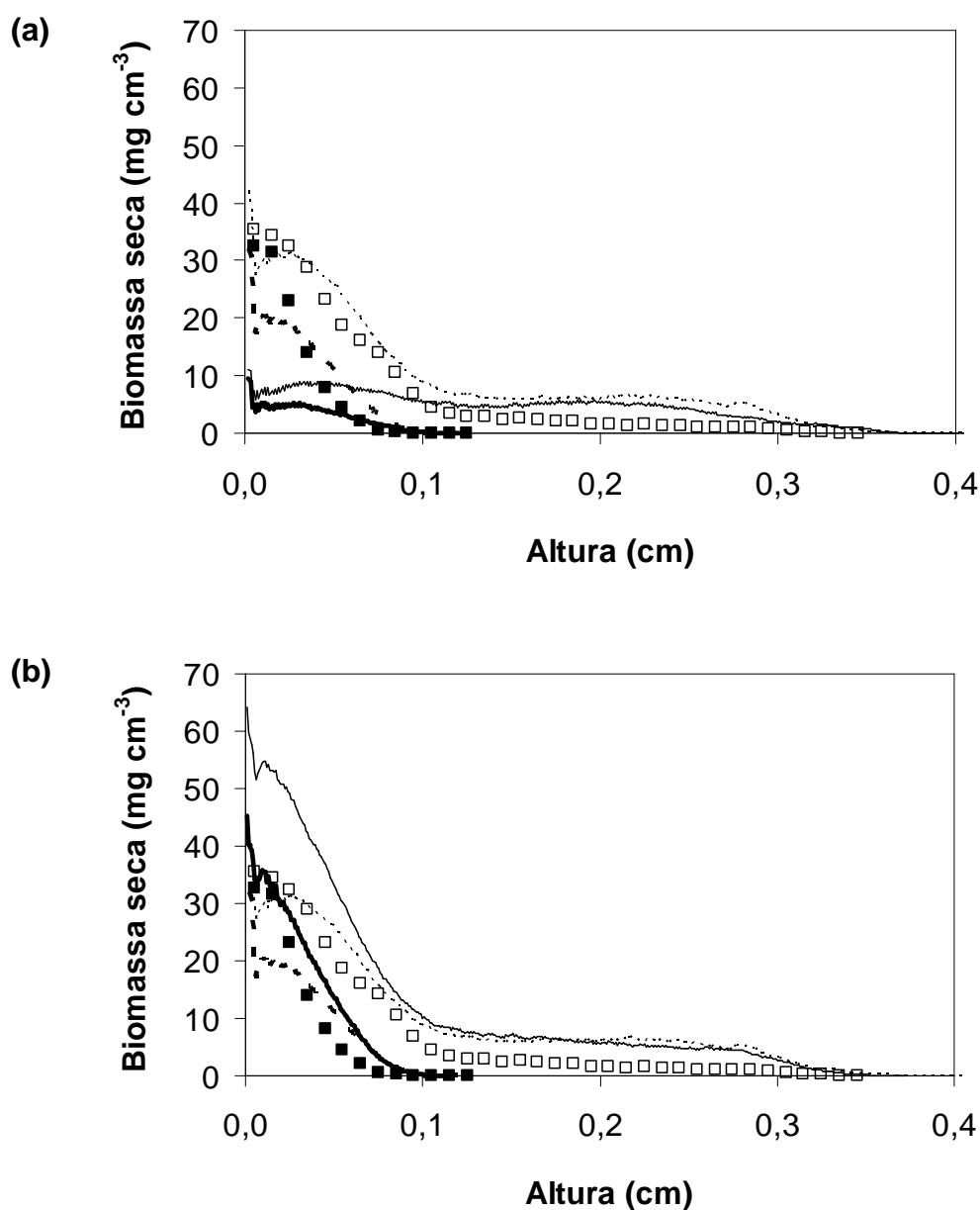


FIGURA 4.9 – AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) VARIANDO O PARÂMETRO mov_{npmax}^V

(■) dados experimentais de 16 h

(□) dados experimentais de 40 h

(···) simulação padrão para 16 h

(---) simulação padrão para 40 h

(a) Simulação com $mov_{npmax}^V = 1$ (—) 16 h e (---) 40 h

(b) Simulação com $mov_{npmax}^V = 3$ (—) 16 h e (---) 40 h

Todas as linhas representam a média de cinco simulações.

4.2.2.3 Influência do Parâmetro α

As probabilidades que controlam a direção de ramificação das hifas vegetativas, em relação à altura, é um outro fator que tem influência significativa sobre os perfis previstos. Estas probabilidades dependem do parâmetro α (equações 4.11 e 4.12). Na Figura 4.10 são mostrados os perfis quando o parâmetro, originalmente igual a 5% (Tabela 4.2, Figura 4.7) é variado em cinco pontos percentuais para mais (resultando em um α de 10%) ou para menos (cujo valor de α será, então, de 0%).

Ao aumentar o parâmetro, em baixas alturas muitas hifas tendem a se desenvolver “no plano z” em que se encontram, já que α está diretamente relacionado a este fato. Das hifas que não voltam na direção para baixo na hora da ramificação, α representa a probabilidade de que a hifa-filha fique no mesmo plano que a ponta da hifa-mãe. Ao se desenvolver dentro de um plano horizontal, a hifa tem mais chance de encostar-se a outra e, desse modo, atingir o número máximo de movimentos não permitidos, mov_{npmax}^V . Com isso, não há um grande aumento da densidade. Além disso, este parâmetro só afeta as hifas vegetativas e, portanto, o perfil para alturas maiores do que 0,1 cm não difere significativamente da simulação padrão.

Por outro lado, levando α a 0%, em baixas alturas, a hifa-filha tem uma maior probabilidade de tomar uma direção “para cima” do que na simulação padrão e não há chances de se desenvolver “no plano z”, mas apenas alguma chance de crescer “para baixo”. Devido ao balanço das hifas “descendo” e “subindo”, isto faz com que a densidade de biomassa aumente rapidamente até 16 h até altura de 0,1 cm. Como a diferenciação só ocorre em 19,2 h, semelhante ao que foi descrito na seção anterior, a biomassa vai continuar a crescer de modo altamente ramificado, o que aumenta rapidamente a densidade. Por isso, quando se olha o perfil simulado para um tempo de 40 h, verifica-se que a densidade para alturas menores do que 0,1 cm é alta, chegando até a 45 mg cm^{-3} em uma altura de 0,05 cm.

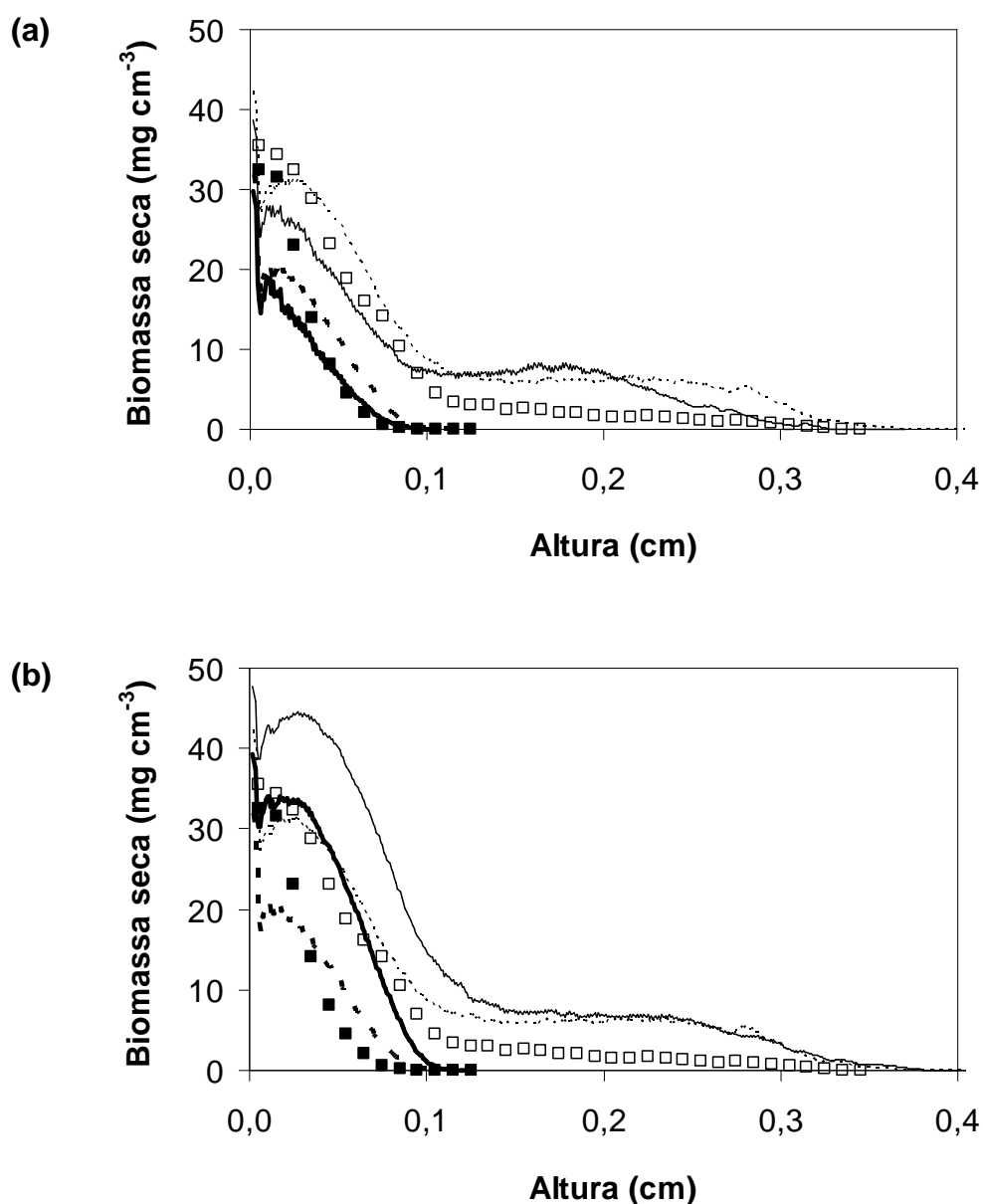


FIGURA 4.10 – AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) VARIANDO O PARÂMETRO α

(■) dados experimentais de 16 h

(***) simulação padrão para 16 h

(a) Simulação com $\alpha = 10\%$ para (—) 16 h e (---) 40 h

(b) Simulação com $\alpha = 0\%$ para (—) 16 h e (---) 40 h

Todas as linhas representam a média de cinco simulações.

(□) dados experimentais de 40 h

(---) simulação padrão para 40 h

4.2.2.4 Influência do Parâmetro $P_{V \rightarrow R}$

Na figura 4.11 são mostrados comparações do modelo aos dados experimentais ao se variar o parâmetro $P_{V \rightarrow R}$ (parâmetro que relaciona a quantia de hifas vegetativas viáveis que se tornam reprodutivas no evento de diferenciação). O parâmetro $P_{V \rightarrow R}$, originalmente com um valor de 50%, foi variado em 50% para mais (igual a 75%) ou 50% para menos (resultando em um $P_{V \rightarrow R}$ de 25%).

A comparação dos resultados somente é válida para um tempo de 40 h, uma vez que no tempo de 16 h a diferenciação ainda não aconteceu (ela ocorre próximo de 20 h). Fica claro que o parâmetro que relaciona a quantidade de hifas vegetativas que se tornam reprodutivas apresenta pouca influência sobre os perfis simulados em 40 h.

A pouca influência deste parâmetro pode ser explicada pelo fato de que a quantidade de hifas que efetivamente ramificam, após algumas iterações, devido aos mov_{npmax}^R igual a 1, acaba sendo a mesma, independente da quantidade de hifas reprodutivas existentes.

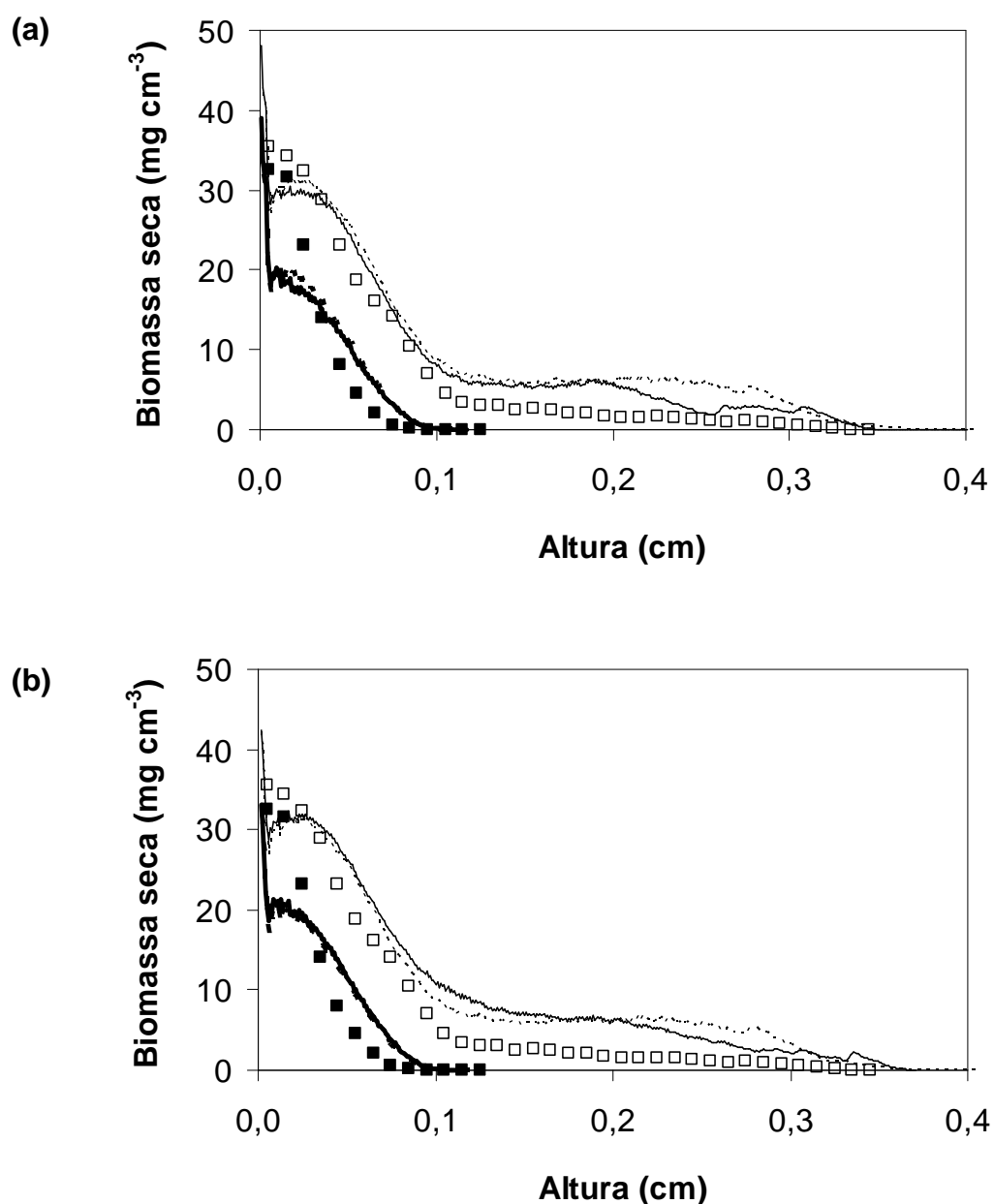


FIGURA 4.11 – AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) VARIANDO $P_{V \rightarrow R}$

(■) dados experimentais de 16 h

(···) simulação padrão para 16 h

(a) Simulação com $P_{V \rightarrow R} = 25\%$ para (—) 16 h e (---) 40 h

(b) Simulação com $P_{V \rightarrow R} = 75\%$ para (—) 16 h e (---) 40 h

Todas as linhas representam a média de cinco simulações.

(□) dados experimentais de 40 h

(---) simulação padrão para 40 h

4.2.2.5 Influência de G

Por fim, na Figura 4.12, são mostradas simulações variando a porcentagem de germinação G , originalmente de 50%, em 50% para mais ou 50% para menos, resultando em G de 75% e 25%, respectivamente.

Este parâmetro, assim com o $P_{V \rightarrow R}$, apresenta pouca influência, sendo que ela é mais acentuada em pequenas alturas. Isto ocorre porque a taxa de germinação influencia os estágios iniciais de desenvolvimento (e, portanto, as hifas que crescem em pequenas alturas). Posteriormente, conforme o fungo se desenvolve e preenche o espaço, a tendência é que a taxa de germinação, que corresponde a um evento no início do cultivo, não mais tenha influência sobre como ocorrerá a distribuição do fungo. Isso decorre do fato que, logo que a biomassa começa a alcançar alturas maiores e começa a ficar mais densa, o fator que exerce maior controle na densidade próxima à superfície é o número máximo de movimentos não permitidos.

Da Figura 4.12 pode-se concluir que a porcentagem de germinação apresenta influência na distribuição de biomassa somente até altura de 0,05 cm e somente sobre as hifas vegetativas. Em alturas maiores do que este valor, o parâmetro G não apresenta influência significativa.

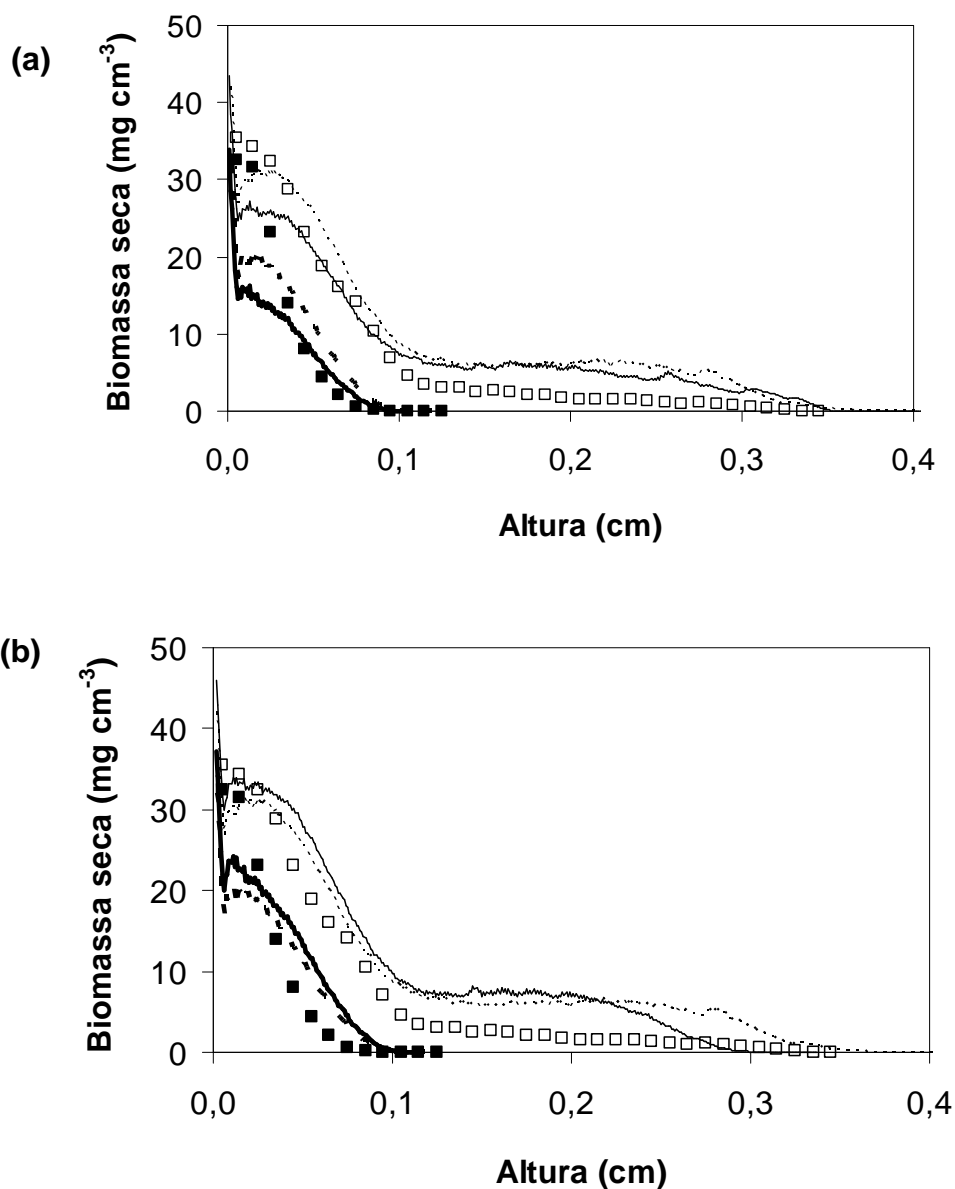


FIGURA 4.12 – AJUSTE DO MODELO (LINHAS) AOS DADOS EXPERIMENTAIS (PONTOS) VARIANDO G

(■) dados experimentais de 16 h

(●●●) simulação padrão para 16 h

(a) Simulação com $G = 25\%$ em (—) 16 h e (---) 40 h

(b) Simulação com $G = 75\%$ em (—) 16 h e (---) 40 h

Todas as linhas representam a média de cinco simulações.

(□) dados experimentais de 40 h

(---) simulação padrão para 40 h

4.3 DISCUSSÃO

4.3.1 Regras que mais influenciam o sistema

O fato de o modelo aqui desenvolvido ser capaz de simular perfis semelhantes aos dados experimentais não é prova de que as regras usadas são regras que governam o crescimento de fungos. Ressalte-se, também, que regras podem parecer bastante empíricas. Os resultados das simulações, entretanto, mostram que o modelo foi capaz de descrever um comportamento complexo e demonstram a flexibilidade do sistema. As regras podem ser facilmente modificadas para adaptar o sistema a outras situações. Na seção 4.3.4 algumas sugestões de modificações das regras serão expostas.

A análise de sensibilidade levantou alguns pontos interessantes sobre: a existência de duas populações, a possibilidade de as hifas se redirecionarem ao encostarem-se em outra hifa e o momento da diferenciação.

O primeiro dos pontos, sobre o desenvolvimento de duas populações com características distintas, foi que a inclusão dos dois tipos de biomassa foi fundamental na obtenção de perfis simulados semelhantes aos perfis experimentais. Isto levanta a questão se, no sistema real, realmente existem duas populações. No caso das microscopias mostradas por Nopharatana (1999) era possível observar qualitativamente a existência de hifas bastante ramificadas em pequenas alturas e hifas que cresciam até alturas maiores e ramificavam menos. Este foi o fato que impulsionou a inclusão de duas populações no sistema desenvolvido no presente trabalho e que, como consequência, permitiu um bom ajuste. No caso de outros fungos, seria necessário obter dados experimentais da velocidade de crescimento e do ângulo de ramificação para as duas populações para adaptar o sistema para descrever o crescimento de outras espécies.

A segunda questão diz respeito ao número de redirecionamentos que as hifas vegetativas podem realizar e se isto realmente ocorre. Por trás disso estariam questões envolvendo os mecanismos fisiológicos deste redirecionamento. Prosser (1995) sugere que, para hifas que crescem sobre o meio, a redução da concentração de oxigênio ao redor de uma hifa poderia sinalizar para o

redirecionamento de uma hifa que se aproxima. Para as hifas aéreas, com abundância de ar por todos os lados, este provavelmente não é o fator determinante. Entretanto, a liberação de algum metabólito pela hifa pode ser uma explicação do afastamento de outra. Até o momento este tipo de sinalização não foi descrito para as hifas aéreas.

A terceira questão diz respeito ao tempo de diferenciação. No modelo, a diferenciação foi do tipo pontual, mas algum mecanismo que indicasse para que as hifas se diferenciasssem poderia ser introduzido, e então a diferenciação não mais necessitaria ocorrer em um momento pré-determinado. A ideia clássica é que, com o passar do tempo e do desenvolvimento do micélio, as condições nutricionais se tornam menos favoráveis, processos de metabolismo secundário são iniciados e isto sinaliza para o desenvolvimento de estruturas reprodutivas (PROSSER; TOUGH, 1991). Para incluir este fenômeno, seria necessário estender o modelo para descrever os fenômenos que ocorrem dentro do substrato, incluindo difusão e reação. Neste caso, o modelo ficaria bem mais complexo, já que não só o desenvolvimento das hifas, mas também o transporte de nutrientes no meio deveriam ser incluídos.

4.3.2 Sistemas de Modelagem Semelhantes

O sistema desenvolvido neste trabalho para a modelagem do crescimento das hifas fúngicas representa um novo sistema para modelar o crescimento discreto em 3D. Até o momento, este é o único sistema discreto do tipo *lattice-based* para a modelagem tridimensional do micélio fúngico. O sistema mais próximo desenvolvido até então foi o de Boswell (2008), do tipo híbrido contínuo-discreto que, entretanto, não tratava a hifa como uma entidade com volume e, por isso, não permitia a quantificação de densidade de biomassa. O sistema desenvolvido neste capítulo é apropriado para investigar vários fenômenos do crescimento de fungos sobre superfícies úmidas e nutritivas em contato com o ar, descrevendo-os através de algumas regras e sem a necessidade de um conjunto de EDPs, as quais podem tornar o sistema matematicamente complexo.

Conforme destacado por Boswell e Hopkins (2008), diferentes estratégias de modelagem do crescimento fúngico são apropriadas para descrever o crescimento em escalas diferentes. Em outras palavras, uma vez que se queira modelar um fenômeno que ocorre em uma escala em particular, a estratégia de modelagem apropriada deve ser cuidadosamente escolhida. A estratégia desenvolvida neste trabalho é apropriada para descrever a ramificação fúngica e densidades locais dentro de uma área ou colônia relativamente pequena e também a densidade em função da altura em sistemas do tipo *overculture*. Além disto, o modelo pode ser facilmente estendido para investigar o crescimento em micro-ambientes heterogêneos, como o ambiente do solo estudado em por Boswell *et al.* (2007) em 2D e por Boswell (2008) em 3D. A possibilidade do uso do sistema para descrever fenômenos que ocorrem em FES será discutida na próxima seção.

O modelo desenvolvido no presente trabalho é do tipo *lattice-based*. Entretanto, mesmo tendo um sistema com uma malha fixa, o qual é computacionalmente menos custoso do que um sistema *lattice-free*, a ponta pode se mover no sistema quase tão livremente quanto em um sistema do tipo *lattice-free*. Isto ocorre porque o diâmetro da hifa é da mesma ordem de magnitude dos cubos que compõem a malha. Além disso, no sistema aqui desenvolvido, uma ponta está em contato com 26 cubos vizinhos, ao passo que em Boswell (2008) (sistema 3D) uma célula estava em contato com apenas 12. O sistema desenvolvido neste trabalho, portanto, tem uma flexibilidade maior, e ainda assim fornece uma maneira simples de checar se intersecções de hifas ocorrem. Isto é vantajoso visto que, em modelos que são realmente *lattice-free*, o número de ângulos possíveis é infinito e ter que checar se duas hifas se cruzam é uma das maiores dificuldades encontradas na implementação do sistema.

O modelo desenvolvido neste trabalho possui a vantagem sobre os modelos de Boswell *et al.* (2007) e Boswell (2008) de modelar explicitamente o crescimento através de segmentos de hifa que possuem uma espessura conhecida. Isso permite que sejam feitas quantificações da densidade de biomassa em função da altura ou, ainda, caso uma colônia fosse modelada, poderia ser feita a quantificação da densidade de biomassa em função do raio. Nos modelos supracitados, as hifas são tratadas como segmentos de linha efetivamente sem espessura. No modelo do tipo *lattice-free* de Carver e Boswell (2008) o mesmo acontece, além de que, neste

último caso, o segmento de hifa possui um comprimento cujo valor é unitário, sem correlação com parâmetros reais, e o resultado é apenas visual.

Outra vantagem do modelo desenvolvido neste trabalho é que a velocidade de extensão pode ser calibrada de acordo com o fungo a ser modelado, seja pela alteração da distância percorrida entre ramificações, ou seja pela alteração do valor do passo de tempo entre ramificações (t_r). Em Boswell *et al.* (2007) e Boswell (2008), a distância percorrida em cada passo no tempo (seja redirecionamento ou ramificação) foi calibrada em 100 μm e o valor de Δt (o passo no tempo percorrido por um segmento de hifa) é descrito apenas como sendo suficientemente pequeno para permitir estabilidade do sistema. Com isso, a velocidade de extensão da hifa nos modelos de Boswell e colaboradores é um parâmetro que não é levado em consideração de maneira explícita.

O sistema deste trabalho foi resolvido para um volume de 5 mm^3 , enquanto Boswell (2008) modelou 1 cm^3 . Os sistemas, entretanto, são diferentes, já que Boswell (2008) modelou um sistema heterogêneo, com as hifas (estruturas discretas) crescendo no meio do solo (modelado como contínuo), e as hifas do sistema deste trabalho cresciam no espaço aéreo, sem contato com o substrato além do ponto de inoculação. Vale destacar, porém, que o sistema desenvolvido neste trabalho pode ser facilmente adaptado para descrever um sistema heterogêneo. Isto poderia ser feito adicionando uma “identidade” a alguns cubos de tal maneira que ali haveria “matéria sólida” e as hifas não poderiam crescer naquele dado espaço. Uma outra característica é que, no modelo desenvolvido no presente trabalho, foi utilizada uma estratégia discreta, já que apenas as hifas precisavam ser modeladas e o ar ao redor foi assumido como não limitante para o crescimento fúngico. Boswell *et al.* (2007) e Boswell (2008), no outro lado, modelaram o substrato ao redor e incorporaram a difusão do substrato externo. Para isto, escolheram a estratégia híbrida. A difusão ou translocação interna de nutrientes, entretanto, pode ser incorporada no sistema desenvolvido neste trabalho futuramente, e uma possível estratégia para este fim será descrita no próximo capítulo.

Uma outra contribuição deste trabalho é o desenvolvimento de um sistema de modelagem para o crescimento de fungos em três dimensões. Poucos são os trabalhos descritos na literatura que enfocam no crescimento em três dimensões. A maioria dos sistemas, por estudar o desenvolvimento dos fungos em colônia, modela apenas o crescimento planar. A primeira das abordagens para descrever o

crescimento tridimensional de fungos foi o modelo do tipo *lattice-free* desenvolvido por Meškauskas *et al.* (2004a,b). Os modelos *lattice-free*, entretanto, como destacado anteriormente, são computacionalmente custosos, já que requerem a comparação de um grande número de segmento de hifas se desenvolvendo em um espaço virtual. Neste trabalho, o modelo *lattice-based* desenvolvido é mais fácil de ser implementado e não exige uma grande capacidade computacional. O modelo híbrido de Boswell (2008), discutido anteriormente, é o segundo relato de modelo tridimensional para o desenvolvimento do micélio fúngico.

Assim, o modelo desenvolvido neste trabalho é o primeiro que não somente descreve o crescimento tridimensional, mas também permite uma quantificação da densidade de biomassa, a qual pode ser comparada a dados experimentais. Isto pode ser importante para o entendimento de como ocorre o crescimento em sistemas com o da fermentação em estado sólido, e as potencialidades do modelo neste sentido serão discutidos na próxima seção.

4.3.3 O Modelo no Contexto da FES

O modelo desenvolvido ao longo deste trabalho possui características bastante distintas do modelo desenvolvido por Nopharatana (1999) para a descrição dos perfis de crescimento das hifas aéreas em FES, já que a abordagem desenvolvida no presente trabalho foi do tipo discreta, diferente da abordagem contínua utilizada pela autora. Entretanto, como o ajuste foi feito aos mesmos dados experimentais, que visavam simular FES, torna-se importante discutir o sistema aqui desenvolvido no contexto deste tipo de processo. Além disso, alguns fenômenos envolvidos em FES podem ser explorados com a estratégia desenvolvida ao longo deste trabalho.

Destaque-se aqui que a utilização de modelos discreto do tipo autômatos celulares para simular o crescimento em condições como da FES havia sido feita anteriormente apenas por Laszlo e Silman (1993) para simular o crescimento bidimensional de uma colônia fúngica sobre meio sólido. O sistema simulado no presente trabalho, do tipo *overculture*, é, de fato, mais próximo do sistema de FES do que o sistema de Laszlo e Silman (1993), e a abordagem aqui utilizada é mais fácil de adaptar para modelar sistemas mais realísticos. Além disso, Laszlo e Silman (1993) obtiveram apenas resultados qualitativos (visuais) de morfologia da colônia, pouco úteis para entender a FES. Neste sentido, o presente trabalho é o primeiro a desenvolver um sistema discreto tridimensional que permite a simulação de hifas aéreas, e o primeiro a comparar as previsões do modelo com dados experimentais e avaliar a aplicabilidade dele em FES.

O modelo desenvolvido no presente trabalho pode ser adaptado para descrever algumas situações importantes em FES, entre elas o desenvolvimento de hifas aéreas entre as partículas da fase sólida de um biorreator, a agregação destas partículas, e a transição das hifas de imersas em água para hifas aéreas. Estas três situações serão discutidas a seguir.

O modelo pode ser adaptado para descrever o crescimento de hifas aéreas no espaço entre as partículas que compõem a fase sólida do leito de um reator de FES. Primeiramente, o sistema deveria ser adaptado para possuir uma distribuição das partículas em 3D. Isto é simples de ser incorporado, uma vez que cada cubo do sistema poderia tomar várias diferentes identidades e vários cubos poderiam ser

especificados como sendo “matéria do substrato”. Isto poderia ser útil para estudar o efeito do crescimento entre as partículas. Por exemplo, com o modelo desenvolvido no presente trabalho, seria possível simular o crescimento de biomassa entre as partículas e usar os resultados para fazer estimativas da perda de carga através do leito. Isto não quer dizer que o modelo ajudaria a desenvolver um sistema de controle, mas o modelo permitiria um entendimento fundamental da relação “biomassa nos poros” e “perda de carga”.

O modelo também pode ser utilizado para estudar a formação de agregados de partículas. A formação de agregados de partículas está relacionada ao surgimento de uma massa compacta que pode quebrar, formar caminhos preferenciais e, com isso, dificultar a manutenção da temperatura em um biorreator (veja seção 2.2). O modelo aqui desenvolvido poderia ser estendido para estudar a agregação das partículas ao incorporar regras que permitissem o desenvolvimento de uma alta densidade de biomassa entre essas partículas, o entrelaçamento de hifas aéreas oriundas de partículas diferentes e até mesmo a penetração nas partículas. Um estudo desses poderia ser utilizado, futuramente, para determinar o melhor momento para a agitação, tal que ocasionaria menos danos ao processo realizado.

O modelo atual não descreve o crescimento de hifas para dentro do substrato, nem dentro do filme de água que muitas vezes está localizado na superfície das partículas sólidas em sistemas de FES. Entretanto, o modelo poderia ser facilmente estendido para descrever o crescimento nestas situações. Ao estender o modelo para descrever as hifas imersas em líquido, o mesmo poderia ser utilizado para explorar uma questão importante levantada por Rahardjo, Tramper e Rinzema (2005), que é quando e como os poros preenchidos por ar do micélio aéreo são preenchidos por água. Mecanismos por trás do desenvolvimento de emaranhados fúngicos são desconhecidos, especialmente aqueles relacionados à transição entre a camada de hifas aéreas para a camada úmida imersa no filme de água (a qual se aproxima mais de um biofilme). Segundo os autores, a transição seria devido ao aumento gradual do empacotamento das hifas aéreas até tal ponto que as forças capilares permitiriam que a água fosse elevada do biofilme ou do substrato para dentro de pequenos poros. Ao introduzir novas regras que falassem a respeito da água no presente modelo (como o movimento da água em função do

empacotamento das hifas), estes fatos poderiam ser estudados e explorados a fim de se obter uma maior compreensão dos fenômenos envolvidos.

4.3.4 Possíveis Modificações e Extensões do Modelo

O modelo descrito ao longo deste trabalho foi desenvolvido especificamente para o crescimento de hifas aéreas de *Rhizopus oligosporus* em sistema *overculture*. Entretanto, como observado pela análise de sensibilidade, o perfil simulado pode ser facilmente modificado pela alteração de algumas poucas regras. Além das modificações nos valores de parâmetros e alterações de regras discutidas na seção anterior, algumas possíveis extensões/modificações no modelo são descritas a seguir:

- o modelo pode ser utilizado para descrever o crescimento de fungos em colônia, sobre a superfície de ágar, simplesmente impondo regras para que as hifas cresçam predominantemente de maneira horizontal e em baixas alturas, com alguma chance de hifas reprodutivas crescerem no espaço aéreo;
- o modelo poderia simular um tempo inicial de crescimento de microcolônias na superfície, para colonizar este espaço, antes da produção de hifas aéreas;
- apesar de este modelo em particular não descrever a anastomose, este seria um fenômeno relativamente simples de incorporar ao considerar que, quando uma ponta encontra uma hifa, uma ligação é estabelecida e a ponta é retirada do sistema;
- no exemplo foi descrito o crescimento de hifas aéreas. Entretanto, um sistema similar pode ser facilmente desenvolvido para descrever o comportamento de hifas penetrantes - o qual poderia ser validado também com dados experimentais obtidos por Nopharatana (1999). Ainda, o sistema poderia ser adaptado para descrever o crescimento de hifas aéreas e penetrantes simultaneamente, bem como das hifas que crescem no filme de água sobre a superfície;

- a ramificação não precisa necessariamente ocorrer a cada intervalo de tempo; pode-se definir uma probabilidade de a hifa ramificar ou de simplesmente redirecionar. Ou, ainda, os passos de tempo podem ser menores do que o intervalo entre ramificações – isto permitiria que tanto eventos de redirecionamento ou ramificação fossem descritos. O fato de apenas o redirecionamento ocorrer, sem necessariamente a ramificação, poderia ser aplicado especialmente para as hifas aéreas, o que ocasionaria uma densidade de biomassa ainda menor em alturas maiores do que 0,1 cm e uma maior aproximação do modelo aos dados experimentais;
- ângulos diferentes podem ser usados. No momento, o modelo descreve o crescimento ou alinhado ou a 45° com os eixos. Outros ângulos de crescimento talvez possam ser também incorporados, conectando não apenas face a face, aresta a aresta ou vértice a vértice, mas também face a aresta, por exemplo;
- os campos de probabilidades podem ser reestruturados a fim de simular outros tipos de tropismos (como os tropismos químicos – quimiotropismos – por exemplo) e não somente o tropismo de afastamento da superfície das hifas reprodutivas e a tendência das hifas vegetativas voltarem que foram estabelecidos no modelo, por exemplo;
- apenas a ramificação apical foi incorporada ao modelo. Entretanto, o modelo pode ser estendido para incorporar a ramificação lateral. Este fenômeno poderia ser incorporado através de uma probabilidade de ramificar, levando em consideração que uma ramificação lateral suprimiria a formação de outra próxima. Vale lembrar, entretanto, que a questão de como são selecionados os locais de ramificação em hifas ainda permanece sem resposta (HARRIS, 2008);
- o sistema simulado foi do tipo fechado, no qual as pontas não podiam sair e pontas vindas de fora não podiam entrar. Uma possibilidade é que uma ponta possa sair do volume do sistema, mas, quando isso ocorresse, uma outra ponta entraria do lado oposto;

- a difusão ou o movimento intracelular de vesículas pode ser incorporado. Apesar de a difusão não ter sido incorporada, no próximo capítulo será mostrado como ela, juntamente com um fluxo convectivo de massa, pode ser incluída em um modelo onde uma única hifa é formada por uma sucessão de cubos semelhantes a tanques em série.

Estas são somente algumas das possíveis modificações no modelo. Como pode ser observado, o sistema é flexível o suficiente para simular outras situações.

5 MODELAGEM DE UMA ÚNICA HIFA ATRAVÉS DE TANQUES EM SÉRIE

No capítulo anterior, foi desenvolvido um modelo para a extensão de hifas que não levou em consideração a possibilidade de limitações no fornecimento de nutrientes ou precursores na ponta da hifa. No presente capítulo, um modelo que descreve o processo de transporte de nutriente até a ponta de uma única hifa é desenvolvido. A proposta do modelo é de descrever o crescimento desta hifa no espaço aéreo a partir de um meio nutritivo, incorporando alguns dos fenômenos envolvidos na extensão de uma hifa descritos na seção 2.1.1. Além disso, os papéis da difusão e da convecção como mecanismos de transporte serão avaliados. O modelo foi desenvolvido de maneira que possa ser incorporado ao modelo dos autômatos celulares descrito no capítulo anterior (capítulo 4). A ideia é que, no futuro, o modelo de desenvolvimento em 3D do micélio possa levar em consideração restrições devido à translocação de solutos dentro das hifas.

O capítulo está organizado da seguinte maneira: primeiro é feita a descrição geral do sistema modelado e da estratégia adotada; em seguida o balanço de massa e as equações relevantes são apresentadas; após as equações, os parâmetros são estimados e os resultados são apresentados na sequência. Por fim, os resultados são discutidos em relação a sistemas semelhantes e quanto a alguns mecanismos incorporados.

SIMBOLOGIA DO MODELO

A	– área transversal de um tanque (μm^2)
C_{fonte}	– concentração de glucose na fonte (mg cm^{-3})
C_i	– concentração de glucose no i -ésimo tanque (mg cm^{-3})
D	– difusividade da glucose no interior da hifa ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
F	– vazão da corrente de líquido que flui entre os tanques ($\mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
k_1	– constante de velocidade da reação de formação de biomassa (s^{-1})
m	– coeficiente de manutenção da hifa em função da glucose ($\text{mg-glucose mg-biomassa-seca}^{-1} \text{s}^{-1}$)
N	– número total de tanques em um dado tempo
r	– velocidade da reação de consumo de glucose ($\text{mg cm}^{-3} \text{s}^{-1}$)
t	– tempo (s)
v_s	– velocidade superficial de líquido no interior da hifa ($\mu\text{m s}^{-1}$)
X	– concentração de biomassa em reserva (mg cm^{-3})
X_{min}	– concentração mínima de biomassa em reserva para haver alongamento (mg cm^{-3})
$Y_{X/G}$	– rendimento de biomassa seca em função da glucose ($\text{mg-biomassa-seca mg-glucose}^{-1}$)
Δx	– comprimento do tanque (μm)
ρ_{hifa}	– densidade de biomassa seca da hifa ($\text{mg-biomassa-seca cm}^{-3}$)

5.1 DESCRIÇÃO GERAL DO SISTEMA

A hifa foi modelada como uma entidade crescente que se desenvolve no espaço aéreo a partir de um meio nutritivo através do aumento da estrutura na ponta. Essa hifa pode ser vista como um conjunto de compartimentos semelhantes a tanques adjacentes bem misturados, de maneira análoga a um conjunto de reatores em série. Essa estratégia foi escolhida para que o modelo pudesse ser compatível com o modelo dos autômatos celulares e também ter a flexibilidade de descrever uma estrutura e uma fisiologia complexa ao longo da hifa. O esquema do modelo é mostrado na Figura 5.1.

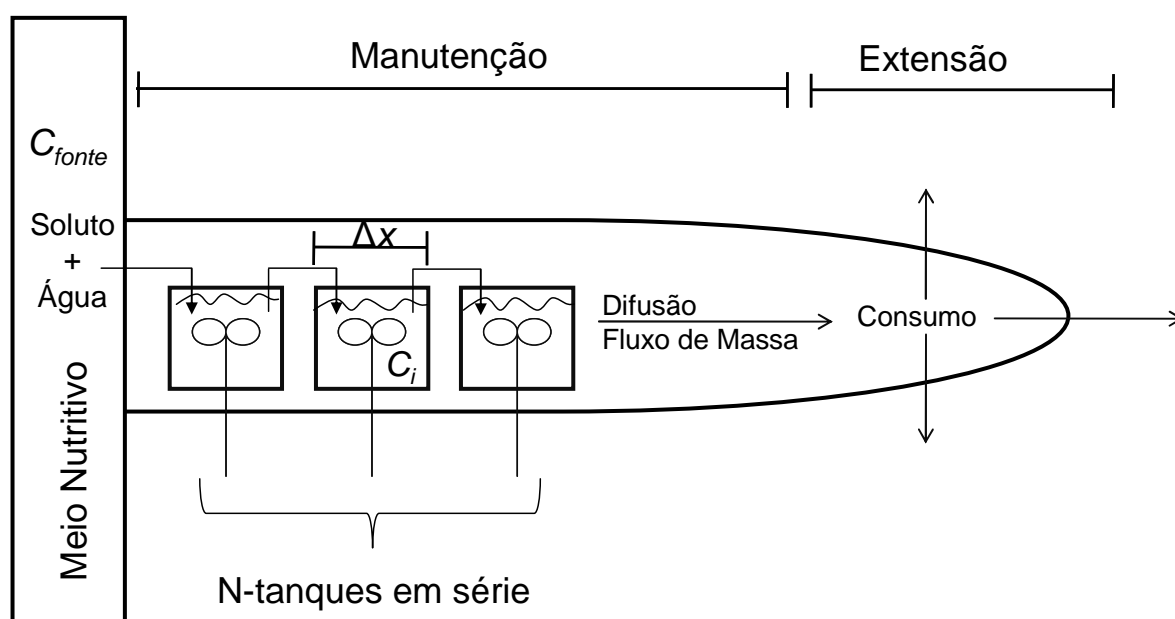


FIGURA 5.1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE UMA HIFA MODELADA COMO UM CONJUNTO DE TANQUES EM SÉRIE

Cada um dos tanques que compõem a hifa é retangular e possui um comprimento Δx (μm) e uma área transversal A (μm^2). Essa área transversal de um tanque é equivalente à área transversal de uma hifa fúngica. De fato, como será mostrado adiante, a área A é igual a Δx^2 e, portanto, cada tanque é cúbico para haver a correspondência com os “cubos” que formam uma hifa no modelo dos autômatos celulares desenvolvido no capítulo 4. Este foi o padrão estabelecido para

os resultados que serão mostrados adiante. Geometrias retangulares (e não necessariamente cúbicas) são possíveis de serem estabelecidas futuramente para simular compartimentos maiores, bem como a modelagem de uma estrutura cilíndrica.

Dentro de cada um desses tanques ocorrem reações para sustentar o crescimento e manutenção da hifa. A condição de mistura perfeita dentro de cada um dos tanques é assumida e, portanto, não são consideradas heterogeneidades em relação à densidade do líquido dentro de um mesmo tanque, por exemplo.

Os tanques que compõem a hifa são construídos por biomassa fúngica de maneira tal que o total de biomassa necessária para construir um tanque é função do volume do mesmo e da densidade do material que compõe o tanque. A densidade de todo o líquido que flui dentro da hifa (todas as correntes líquidas) e da biomassa úmida que forma um tanque será, por simplificação, próxima à densidade de água, condição esta assumida por Nopharatana (1999) e por Rajagopalan e Modak (1995) no desenvolvimento de modelos para o crescimento fúngico em FES (visto que a umidade de um fungo pode chegar até valores maiores do que 90%). Cada um dos tanques possui uma densidade de biomassa seca denotada por ρ_{hifa} , fazendo com isso uma analogia com a biomassa seca geralmente obtida como medida experimental do desenvolvimento dos fungos.

O modelo considera o crescimento a partir da superfície de um meio nutritivo que é composto por glucose dissolvida em água, em uma concentração que será chamada de C_{fonte} (mg cm^{-3}). A glucose é, então, o único componente responsável por promover o crescimento, já que é a fonte de carbono mais comumente utilizada por organismos aeróbicos. No modelo desenvolvido, a concentração de glucose neste meio nutritivo é assumida como constante e é feita a consideração de que esta fonte é inesgotável. A glucose difunde então a partir desta fonte para dentro do primeiro tanque, com uma difusividade D ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). Além do transporte por difusão, mais material pode entrar neste primeiro tanque por convecção através de uma corrente de alimentação de entrada, chamada aqui de corrente F , cujas unidades de vazão são unidades de volume por tempo ($\mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$). Não há mais entrada de material para dentro da hifa além do que entra neste primeiro.

A corrente de entrada carrega solução para dentro da hifa em uma concentração idêntica à da fonte. Do primeiro ao segundo tanque existe uma corrente que os liga, sendo que a vazão é também F e, portanto, o volume de líquido

em cada tanque não muda. Líquido flui do segundo ao terceiro tanque, também com vazão F , e assim sucessivamente. Na saída de cada tanque, a concentração dos componentes é idêntica à concentração no interior daquele tanque, devido à condição de mistura perfeita.

A glucose é consumida numa velocidade r (s^{-1}) no último tanque para formar biomassa necessária à construção de um novo tanque (essa reação será descrita em detalhes na seção 5.1.1). Nos demais tanques, a glucose é consumida apenas pela reação de manutenção de biomassa, reação esta caracterizada pelo coeficiente de manutenção m ($\text{mg-glucose mg-biomassa-seca}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Considerando um tanque genérico qualquer do meio da hifa, denominado tanque i , cujos vizinhos são o tanque $i-1$ (mais próximo do meio nutritivo) e o tanque $i+1$, o balanço de massa geral para a glucose é dado pela equação 5.1:

$$A\Delta x \frac{dC_i}{dt} = F(C_{i-1} - C_i) + DA\left(\frac{C_{i-1} - C_i}{\Delta x}\right) - DA\left(\frac{C_i - C_{i+1}}{\Delta x}\right) - m\rho_{hifa}A\Delta x \quad (5.1)$$

onde C_i refere-se à concentração de glucose no tanque i e os demais símbolos foram explicados anteriormente. Nesta equação, o primeiro termo do lado direito é o termo convectivo (entrada – saída), o segundo e terceiro são os termos difusivos (entrada e saída, respectivamente) e o quarto está relacionado com a massa de glucose gasta para a manutenção de cada tanque.

Simplificando os termos da equação (5.1), o balanço de massa para a glucose então fica conforme representado na equação 5.2:

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{F}{A} \frac{(C_{i-1} - C_i)}{\Delta x} + D\left(\frac{C_{i-1} - 2C_i + C_{i+1}}{\Delta x^2}\right) - m\rho_{hifa} \quad (5.2)$$

Para o primeiro tanque (o tanque mais próximo da fonte), o termo que representa a difusão do tanque anterior (fonte) para o primeiro tanque não é do tipo centro-centro (centro de um tanque até centro do outro), mas sim contorno-centro (difusão da fonte no contorno até o centro do primeiro tanque). Como foi assumido que a fonte de nutriente na origem era continuamente repostada e a glucose era adquirida pela hifa a partir dela (seja por difusão ou por fluxo convectivo), a condição de contorno fixa foi utilizada (ou seja, a concentração na fonte é igual a C_{fonte} e não

muda). De maneira análoga ao que foi feito para um tanque do meio, para o primeiro tanque um balanço pode ser realizado. Neste primeiro tanque há, então, o termo convectivo (entrada-saída), o termo difusivo de entrada do tipo contorno-centro e da saída do tipo centro-centro e o termo referente ao consumo para manutenção. A equação já simplificada para o primeiro tanque é mostrada na equação 5.3:

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F}{A} \frac{(C_{fonte} - C_1)}{\Delta x} + D \left(\frac{C_{fonte} - C_1}{0,5\Delta x^2} \right) - D \left(\frac{C_1 - C_2}{\Delta x^2} \right) - m\rho_{hifa} \quad (5.3)$$

Para o último tanque (que será chamado de N -ésimo tanque), não há o termo de difusão de soluto para fora da hifa. Do mesmo modo, em relação ao fluxo convectivo, será considerado que há o bombeamento de água para fora da hifa, mas não do soluto glucose (e, portanto, também não há saída de glucose por meio do fluxo convectivo). Isso busca incorporar o efeito que a evaporação de água pode provocar sobre a translocação de nutrientes, aumentando a velocidade em que esta translocação ocorre, fenômeno este especialmente evidente em hifas reprodutivas (JENNINGS, 1995). Além disto, é no último tanque que ocorre gasto de glucose para formar biomassa em reserva, a uma velocidade de reação r . Ao juntar essas informações, o balanço de massa para o último tanque fica conforme a equação 5.4:

$$\frac{dC_N}{dt} = \frac{F}{A} \frac{C_{N-1}}{\Delta x} + D \left(\frac{C_{N-1} - C_N}{\Delta x^2} \right) - r - m\rho_{hifa} \quad (5.4)$$

onde N é o número total de tanques em um dado tempo.

Para ser possível de incorporar este modelo ao modelo desenvolvido no capítulo anterior, é necessário fazer com que, no momento em que há alongamento, um cubo apareça instantaneamente, mesmo que esse modo de crescimento não seja suave. Devido a este fato, o alongamento de uma hifa ocorre por meio de um tanque que “aparece” (obedecida à condição de alongamento, que será descrita adiante) e N aumenta em uma unidade. Em outras palavras, sempre que a decisão de alongar for positiva, o número de tanques aumenta em um.

Uma outra condição assumida no desenvolvimento do modelo é que tanto o fluxo F como a área transversal A são constantes. Com isso, o termo F/A pode ser reescrito como a velocidade superficial do líquido no interior da hifa e será, daqui em

diante, representado como v_s ($\mu\text{m s}^{-1}$). Isto, de fato, é o modo como os dados experimentais de translocação de nutrientes no interior da hifa são, em geral, apresentados (CAIRNEY, 2005).

5.1.1 Reação de Formação de Biomassa

A extensão das hifas é um exemplo extremo de polaridade do crescimento celular restrito a uma zona estreita próxima ao ápice da hifa. Por exemplo, a taxa de síntese de material que compõe a parede celular num compartimento apical da hifa de comprimento de 1 μm pode ser até 50 vezes maior do que a taxa a 50 μm atrás dela (GOODAY; TRINCI, 1980³, citado por GOW, 1995). No modelo apresentado neste capítulo, este fenômeno foi incorporado no modelo pela restrição da reação de síntese no tanque da ponta da hifa (N -ésimo tanque). Neste N -ésimo tanque foi considerado que a glucose é consumida de maneira irreversível para formar biomassa “em reserva” que será denotada por X (mg-biomassa-seca cm^{-3}). Isto é uma simplificação, visto que, primeiro, a construção de nova biomassa requer uma fonte de nitrogênio, que não é contido na glucose e que deve ser fornecido na forma de aminoácidos; segundo, a construção de nova biomassa envolve um conjunto de reações intrincadas e não apenas uma; e, terceiro, não existe em hifas reais um “espaço” onde pode se armazenar toda a biomassa formada até que um novo tanque seja adicionado. A conversão de glucose em biomassa segue uma reação de primeira ordem, com constante de velocidade k_1 (s^{-1}). A reação é mostrada na equação 5.5 e a expressão da velocidade de reação na equação 5.6:



$$r = k_1 C_N \quad (5.6)$$

³ GOODAY, G. W.; TRINCI, A.P.J. Wall structure and biosynthesis in fungi. **Symposia of the Society for General Microbiology**, v. 30, p. 207-252, 1980

Considerando um rendimento de biomassa seca em relação à glucose de $Y_{X/G}$ (mg-biomassa-seca mg-glucose⁻¹), a equação que descreve a formação de biomassa a partir da glucose é dada pela equação 5.7:

$$\frac{dX}{dt} = Y_{X/G} r = Y_{X/G} k_1 C_N \quad (5.7)$$

Assim, só resta definir quando ocorre a decisão de acrescentar um novo tanque ao final da hifa em construção. Neste modelo é proposto que isto ocorre quando a quantidade de biomassa formada a partir da glucose acumulada no último tanque for suficiente para a construção de um novo tanque, ou seja (equação 5.8):

$$A\Delta x X_{\min} \geq A\Delta x \rho_{hifa} \rightarrow X_{\min} \geq \rho_{hifa} \quad (5.8)$$

Quando isto ocorre, N é aumentado em uma unidade e o novo tanque aparece então com zero de concentração de glucose e de biomassa de reserva. Qualquer excesso de glucose permanece no penúltimo tanque e o excesso de biomassa é desprezado.

5.1.2 Condições Iniciais

Para iniciar a simulação, foi assumido que no tempo zero a hifa já contém três tanques: o tanque 1, próximo à fonte; o tanque 2, intermediário; e o tanque 3, um tanque da ponta. Para estes três tanques foi assumido que a concentração inicial de glucose é igual a zero, ou seja (equação 5.9):

$$C_i = 0 \quad 1 \leq i \leq 3 \quad (5.9)$$

Além da condição inicial de zero de glucose, foi assumido também que a concentração de biomassa em reserva no último tanque é também igual a zero, ou seja (equação 5.10):

$$X = 0 \quad (5.10)$$

Como a dimensão espacial já foi discretizada ao assumir que a hifa é composta por um conjunto de pequenos tanques, as condições de contorno já foram incorporadas nas equações 5.3 e 5.4.

5.1.3 Outras Suposições do Modelo

As seguintes suposições e simplificações não descritas até aqui também foram feitas:

- Tanto o coeficiente de manutenção da biomassa (m) quanto o coeficiente de rendimento de biomassa em função da glucose ($Y_{X/G}$) são constantes ao longo do tempo;
- A difusividade é constante ao longo do espaço e do tempo;
- A biomassa sintetizada apenas no último tanque fica restrita a este compartimento;
- Tanto a densidade das correntes quanto de biomassa são constantes ao longo do tempo e do espaço.

5.1.4 Estimação de Parâmetros e Calibração do Modelo

O modelo foi calibrado de modo a ter uma analogia com o modelo dos autómatos celulares descrito no capítulo 4 e também com o crescimento aéreo de *Rhizopus oligosporus* sobre PDA descrito por Nopharatana (1999). Como muitos parâmetros não estão disponíveis para o fungo em questão, parâmetros de outros fungos foram utilizados, usando valores de fungos filamentosos, sempre que disponíveis. Os parâmetros não disponíveis foram escolhidos e serão posteriormente variados. Na Tabela 5.1 todos os parâmetros são descritos, juntamente com seus valores.

O valor do coeficiente de rendimento em função da glucose ($Y_{X/G}$) foi determinado experimentalmente por Nopharatana (1999) para *Rhizopus oligosporus* e tem um valor de 0,45 mg-biomassa-seca mg-glucose⁻¹. O valor do coeficiente de manutenção em função da glucose (m) utilizado foi o medido por Bull e Trinci (1977) para *Aspergillus nidulans* e é igual a 5×10^{-6} mg-glucose mg-biomassa-seca⁻¹ s⁻¹.

A densidade da biomassa fúngica em base seca (ρ_{hifa}) foi calculada baseada em uma umidade de 90% e foi assumido que a densidade de biomassa fúngica úmida é igual à densidade da água. Portanto, o valor utilizado de ρ_{hifa} foi de 100 mg cm⁻³. Estas condições foram as mesmas assumidas por Nopharatana (1999).

A difusividade da glucose dentro da hifa foi assumida como sendo igual à difusividade da glucose na água a 37°C, visto que Olsson e Jennings (1991) determinaram a difusividade da glucose em hifas de *Rhizopus nigrican* e reportaram o valor como sendo da mesma ordem de magnitude da difusividade na água.

A concentração de glucose na fonte (C_{fonte}) é a concentração utilizada para fazer o meio de cultivo PDA e reportado por Atlas (2006).

O valor do comprimento de cada tanque (Δx) foi assumido como sendo 10 μ m para haver a correspondência com os “cubos” utilizados para construir as hifas do capítulo 4.

A velocidade de translocação de nutrientes marcados radioativamente em basidiomicetos varia em algumas ordens de magnitude, de 5×10^{-2} μ m s⁻¹ a 1×10^3 μ m s⁻¹ (CAIRNEY, 2005). Lew (2005) avaliou o fluxo de massa e a pressão

interna em hifas de *Neurospora crassa* e relatou um valor de fluxo convectivo de $5 \mu\text{m s}^{-1}$. Um valor de $1,5 \mu\text{m s}^{-1}$ foi em princípio usado neste modelo para que a hifa atingisse uma altura semelhante à máxima determinada por Nopharatana (1999). Nos resultados, este parâmetro será variado para demonstrar a influência dele sobre o sistema. Este valor de v_s foi estimado mantendo um k_1 fixo de $0,01 \text{ s}^{-1}$. Como o k_1 é um parâmetro sem medida experimental, a influência dele sobre os resultados também será avaliada.

TABELA 5.1 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A RESOLUÇÃO DO MODELO DOS TANQUES EM SÉRIE

Parâmetro	Valor	Unidade	Fonte
D	$6,9 \times 10^{-2}$	$\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$	Hayduk e Laudie (1974)
m	5×10^{-6}	$\text{mg-glucose mg-biomassa-seca}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Bull e Trinci (1977)
$Y_{X/G}$	0,45	$\text{mg-biomassa seca mg-glucose}^{-1}$	Nopharatana (1999)
ρ_{hifa}	100	$\text{mg-biomassa-seca cm}^{-3}$	Nopharatana (1999)
C_{fonte}	20	$\text{mg-glucose cm}^{-3}$	Atlas (2006)
Δx	10	μm	Capítulo 4
v_s	1,5	$\mu\text{m s}^{-1}$	Escolhido
k_1	0,01	s^{-1}	Escolhido

O modelo consiste de um conjunto de equações diferenciais ordinárias (EDOs) que foi resolvido utilizando o método de Runge-Kutta de quarta ordem programado na sub-rotina DRKGS em linguagem FORTRAN 90 e compilado através do *software* Compaq Visual Fortran Professional Edition 6.5.0. Os resultados mostrados na próxima seção foram obtidos em uma máquina com processador Intel® Celeron® M440 (1,86 GHz) com 1 GB de memória RAM e com o sistema operacional Windows Vista™.

5.2 RESULTADOS

A seguir serão mostrados os resultados obtidos com o modelo descrito na seção anterior e com os parâmetros da Tabela 5.1. Posteriormente, os dois parâmetros estimados (v_s e k_1) serão variados para avaliar como eles afetam os perfis previstos pelo modelo. Esta investigação visa mostrar o papel importante que o fluxo de massa desempenha como mecanismo de transporte em face da difusão apenas, papel este que até o momento foi pouco estudado e precisa ser melhor avaliado.

O comprimento da hifa em função do tempo, de acordo com as equações e parâmetros estabelecidos na seção anterior, é mostrado na Figura 5.2.

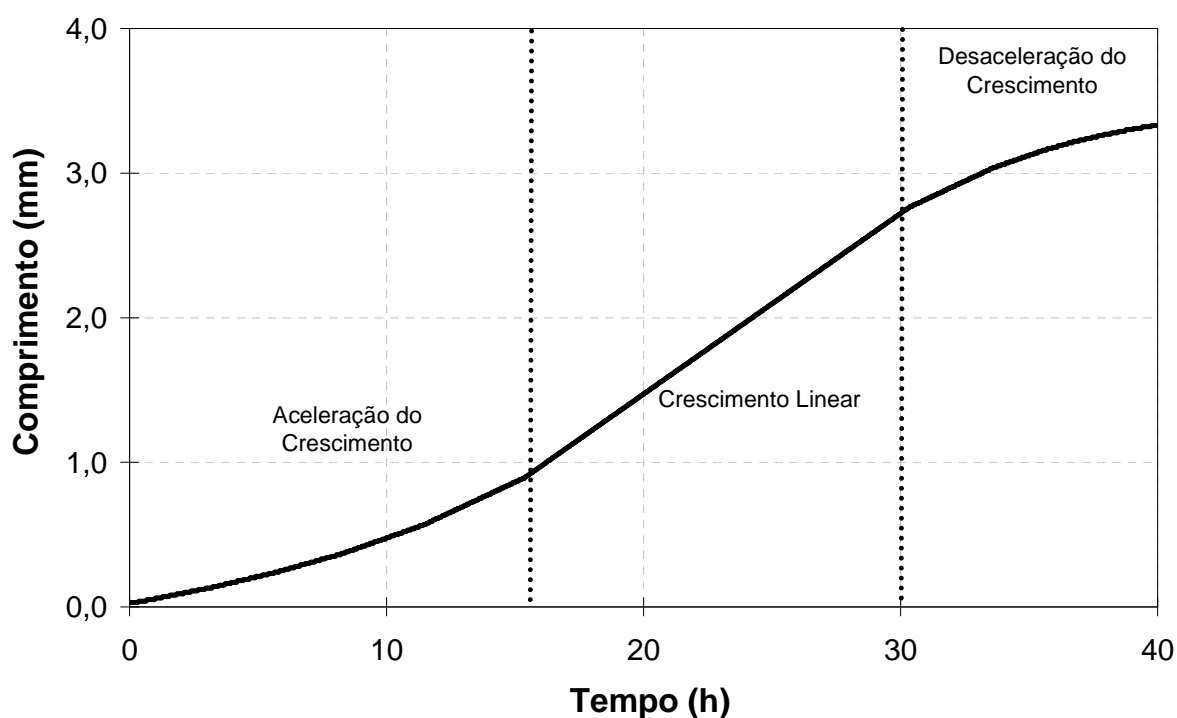


FIGURA 5.2 – COMPRIMENTO DE UMA ÚNICA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO

Os valores dos parâmetros v_s e k_1 foram escolhidos de modo a se obter um comprimento máximo em 40 h de cultivo semelhante à altura máxima das hifas aéreas obtidas por Nopharatana (1999) no sistema experimental *overculture* do crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus* sobre PDA. Ressalte-se que, como

Nopharatana (1999) mostrou dados apenas para 16 h e 40 h, é possível que a altura de 3,5 mm tenha sido alcançada antes de 40 h. Além disso, a maioria das hifas não chegou até esta altura, visto que a biomassa concentra-se em alturas mais baixas (veja Figura 2.9b). A hifa simulada neste capítulo, por chegar até essa altura de 3,5 mm, tem as características semelhantes ao que foi chamado de uma hifa reprodutiva no modelo do capítulo 4.

Na Figura 5.2, observa-se uma fase de aceleração do crescimento do comprimento da hifa entre 0 e 15 h; uma fase de crescimento aproximadamente linear, com velocidade constante entre 15 h e 30 h; e, então, uma desaceleração entre 30 h e 40 h, com tendência a atingir um comprimento constante próximo de 3,5 mm. Este tipo de comportamento é geralmente o comportamento descrito para uma única hifa alongando (PROSSER, 1995).

Na Figura 5.3 são mostrados as variações, no tempo, da concentração de glucose para várias posições dentro da hifa. Como, nessa figura, a linha pontilhada que une as diversas linhas representa a concentração de glucose no tanque da ponta, a linha de cada comprimento se inicia nela, no momento em que a ponta atinge aquele comprimento.

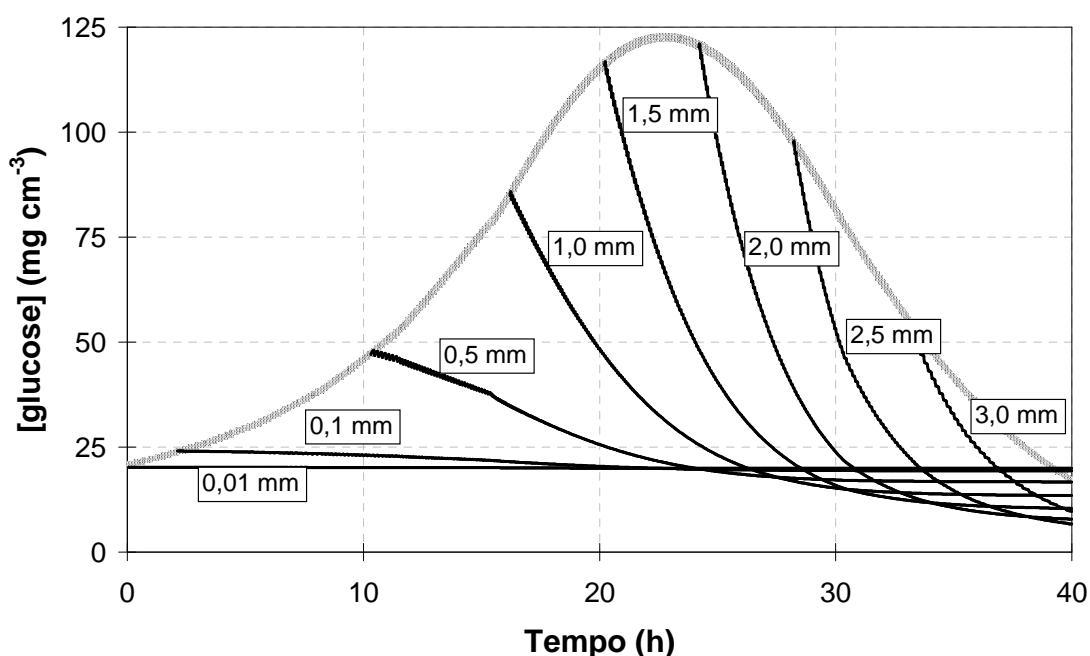


FIGURA 5.3 – CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA VÁRIOS COMPRIMENTOS DE HIFA

A linha pontilhada que une as diversas linhas representa a concentração de glucose no tanque da ponta da hifa em função do tempo.

O modelo prevê um acúmulo de glucose na ponta da hifa entre 0 e 25 h, que se deve ao fluxo convectivo (isto ficará evidente quando v_s for variado): o tanto de glucose transportado é mais do que suficiente para sustentar a manutenção e o alongamento até este momento. Para tempos maiores do que 25 h, a hifa é comprida o bastante e o consumo de glucose para manutenção, enquanto ela é transportada para a ponta, faz com que a glucose chegue na ponta mais lentamente do que está sendo consumida na reação para produzir a nova biomassa e, por isso, diminui a concentração de glucose no último tanque.

Se a Figura 5.3 for relacionada à Figura 5.2, observa-se que as fases de crescimento (aceleração, velocidade constante e desaceleração) estão diretamente relacionadas com a quantidade de glucose acumulada na ponta. Tanto no início quanto no final da fase de crescimento linear, por exemplo, a concentração de glucose na ponta é próxima de 80 mg cm^{-3} . Na Figura 5.4, que mostra o gráfico da concentração de glucose em função do comprimento, para diferentes tempos de crescimento da hifa, o mesmo pode ser observado.

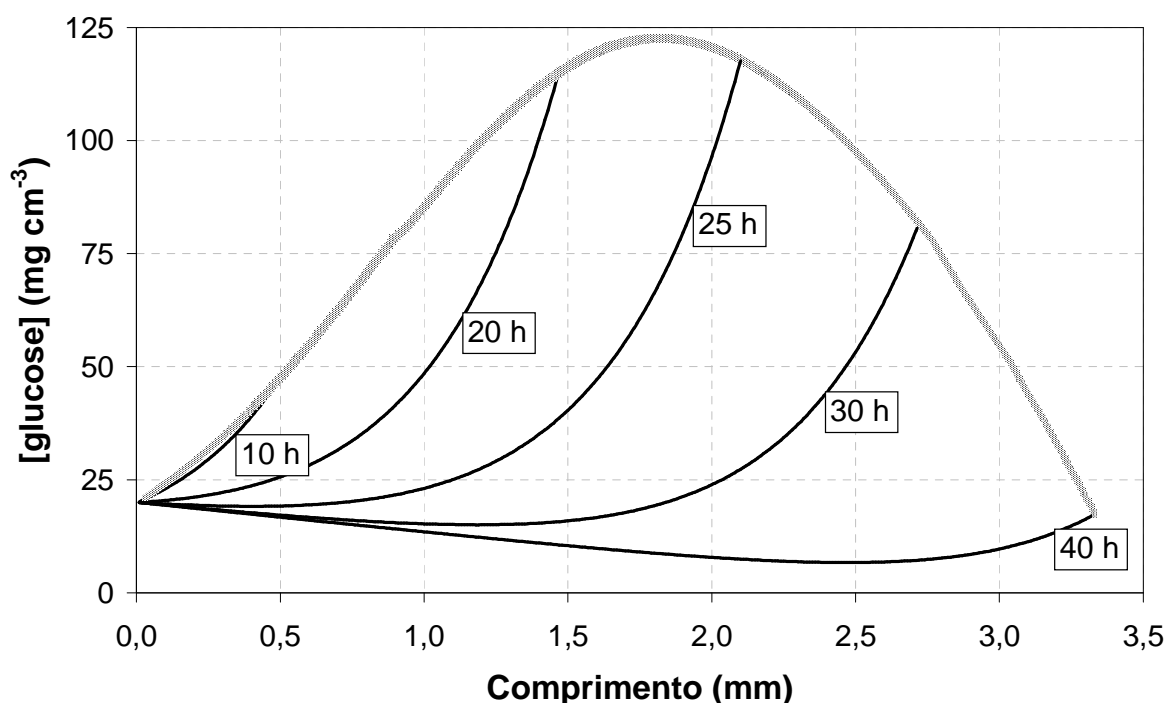


FIGURA 5.4 – CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA PARA VÁRIOS TEMPOS

A curva pontilhada que une as diversas linhas representa a concentração de glucose no tanque da ponta da hifa em função do comprimento.

De acordo com a previsão do modelo, a concentração de glucose, até 20 h, aumenta quanto mais perto da ponta da hifa. Isto pode decorrer do fato de que uma grande quantidade de solução de glucose é transportada para a ponta pelo fluxo convectivo e apenas a água sai da hifa, mas não a glucose. A glucose acumula na ponta, o que dá um gradiente para difusão em sentido contrário ao fluxo. Para tempos maiores do que 25 h, porém, há um mínimo na concentração de glucose em algum ponto no meio da hifa. A explicação deste fato é a mesma, só que, nestes casos, a quantidade consumida para manutenção é grande (já que, quanto maior a hifa, maior o consumo de glucose para manutenção), há pouco acúmulo na ponta e pouca glucose volta por difusão até um certo comprimento.

Conforme o tempo decorre e a hifa alonga, a glucose consumida para a manutenção em todo o comprimento da hifa é tanta que a velocidade de chegada de glucose na ponta é pequena. Segundo o modelo, a velocidade de produção da biomassa em reserva X na ponta é diretamente proporcional à concentração de glucose na ponta. Então, se a concentração na ponta cai, a velocidade de produção de X (e, portanto, a velocidade de extensão) vai também cair. Como a reação que controla a extensão da hifa é de primeira ordem, a hifa pararia completamente de crescer quando a concentração de glucose na ponta fosse zero.

A fim de mostrar o papel do fluxo convectivo em relação à difusão, a velocidade superficial das correntes de líquido (v_s) foi levada a zero. Igualar v_s a zero é equivalente a dizer que o único mecanismo de transporte atuando é a difusão. Como v_s é um parâmetro incerto e pode variar até mesmo em algumas ordens de magnitude, ele foi também dobrado para verificar a influência deste parâmetro sobre os perfis de comprimento e concentração de glucose. Valores maiores não foram testados, visto que o objetivo era de ter um comprimento próximo à altura máxima obtida experimentalmente por Nopharatana (1999). O resultado da variação de v_s é mostrado na Figura 5.5.

Quando apenas a difusão atua como mecanismo de transporte das hifas aéreas ($v_s = 0 \mu\text{m s}^{-1}$) o modelo prevê que ela não seria suficiente para sustentar um crescimento até à altura de 3,5 mm que foi medida por Nopharatana (1999) dentro de 40 h. Conforme observado por Davidson e Olsson (2000), a difusão parece ser um mecanismo de transporte eficiente para distâncias menores do que 1 cm em basidiomicetos, mas não o suficiente para manter a velocidade de suprimento de nutrientes que sustente o crescimento em distâncias maiores. Como pode ser visto

na Figura 5.5, no caso do modelo aqui desenvolvido para *Rhizopus oligosporus* (um zigomiceto), a difusão seria eficiente para sustentar o crescimento até uma altura de apenas 1 mm, mas não distâncias maiores. Fazendo a analogia com o modelo desenvolvido no capítulo anterior, pode-se conjecturar que a difusão poderia ser o único mecanismo para as hifas vegetativas (aquelas que crescem até próximo de 20 h e formam uma rede altamente densa e ramificada em alturas de até 1 mm), mas não seria o único mecanismo de transporte para as hifas reprodutivas (que crescem mais rapidamente, em alturas maiores e são menos ramificadas).

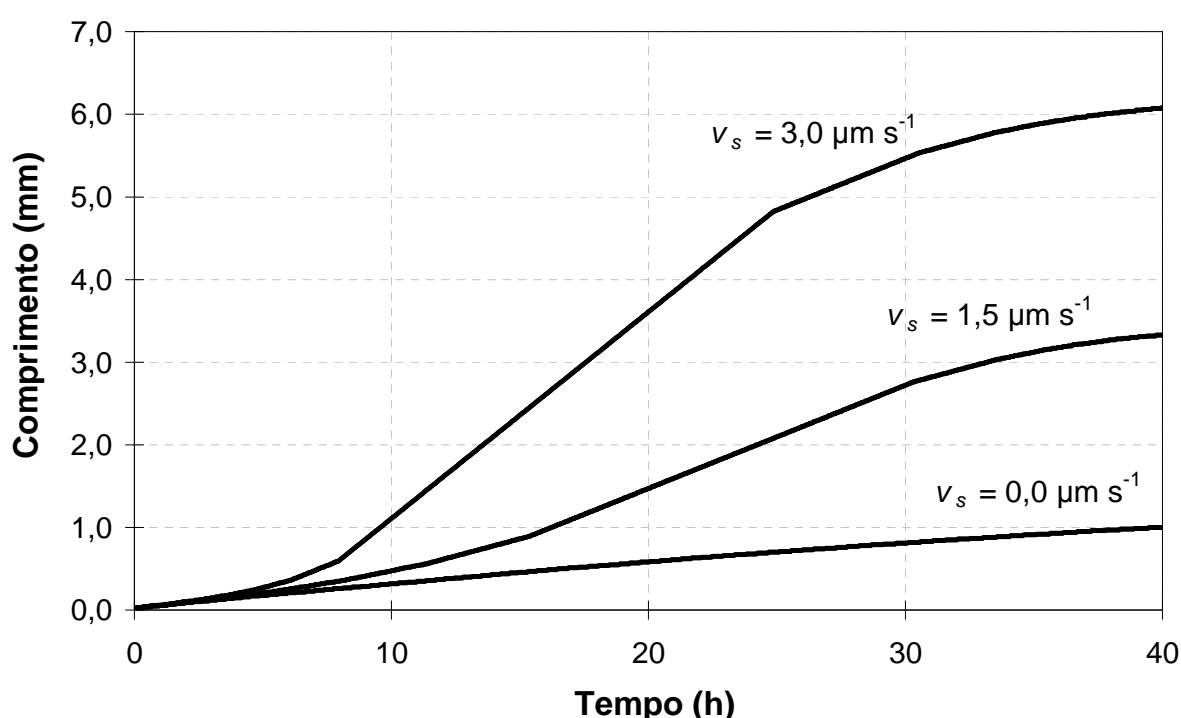


FIGURA 5.5 – COMPRIMENTO DE UMA ÚNICA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUXO CONVECTIVO

A concentração de glucose na ponta da hifa em função do tempo para as três velocidades de fluxo convectivo é mostrada na Figura 5.6. Na Figura 5.7 a concentração de glucose no tanque da ponta em função do comprimento é mostrada. A partir da Figura 5.6, as curvas mostradas referem-se apenas à concentração de glucose na ponta da hifa, seja em função do tempo ou em função do espaço.

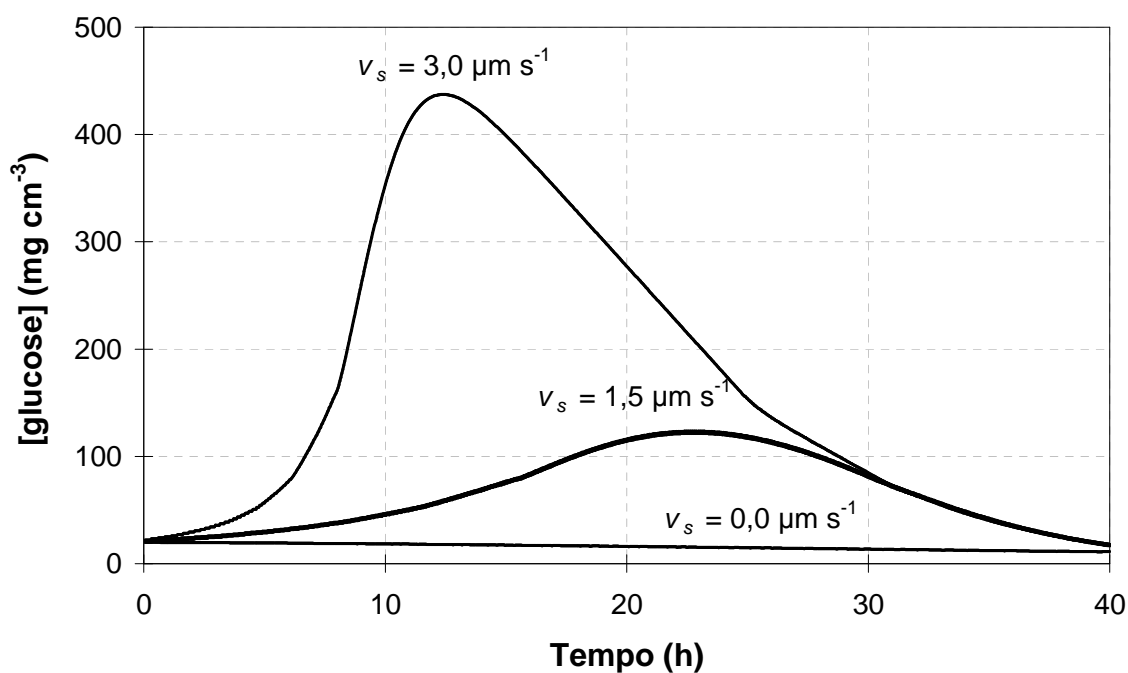


FIGURA 5.6 – CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NO TANQUE DA PONTA DA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIFERENTES VALORES DE FLUXO CONVECTIVO

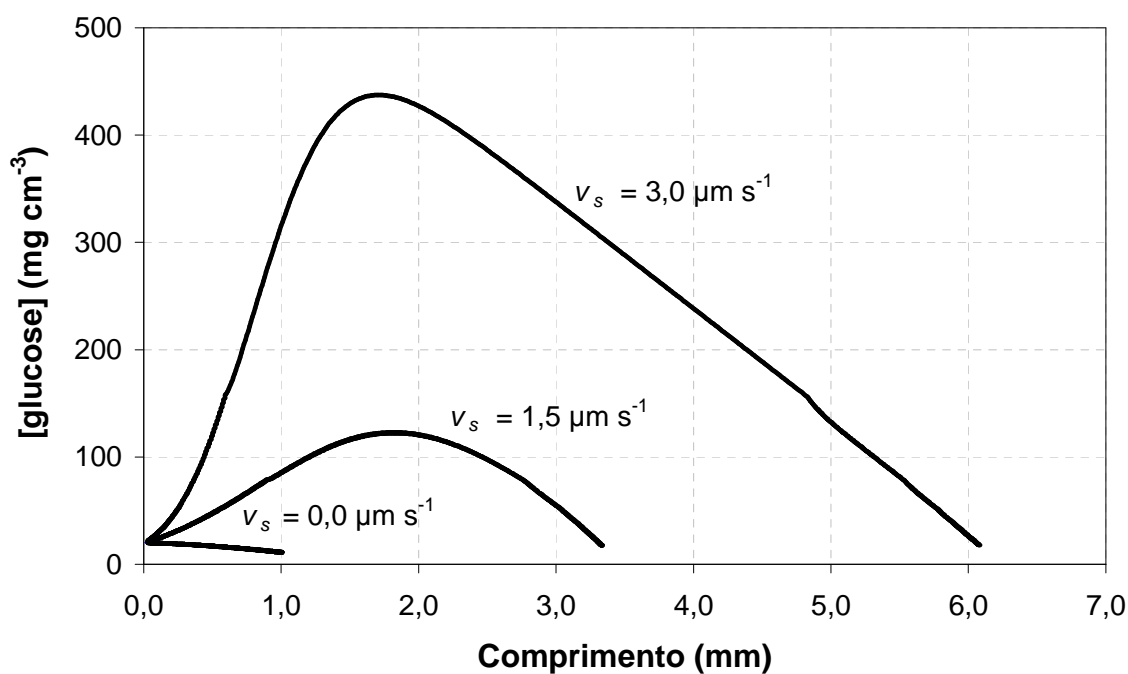


FIGURA 5.7 – CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NO TANQUE DA PONTA DA HIFA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA ATÉ 40 h PARA TRÊS DIFERENTES VALORES DE FLUXO CONVECTIVO

A principal característica das curvas com v_s igual a $0 \mu\text{m s}^{-1}$ é que, com a difusão apenas como mecanismo de transporte, a quantidade de glucose acumulada na ponta é baixa. Se a concentração é baixa, como a reação de formação de biomassa é de primeira ordem, a velocidade desta reação é também baixa. Portanto, leva mais tempo para acumular o X_{min} necessário para a construção de um novo tanque. Com isso, a altura máxima atingida em um mesmo tempo é menor.

Ao dobrar o valor de v_s , a concentração de glucose na ponta chega a um valor de 440 mg cm^{-3} para o tempo de 12 h. Isto é quase quatro vezes a concentração máxima de glucose na ponta previsto para o caso com v_s igual a $1,5 \mu\text{m s}^{-1}$, que é de 120 mg cm^{-3} em 22 h. A altura máxima atingida de 6,1 mm, entretanto, não chega a ser o dobro.

Uma outra característica interessante de ser observada dos gráficos das Figuras 5.6 e 5.7 é que, independentemente do valor de v_s , a concentração de glucose no tanque da ponta após 40 h é aproximadamente a mesma para os três casos estudados. Como a extensão da ponta depende diretamente da concentração neste último tanque, pode-se pressupor que, em torno de 40 h, a capacidade de extensão (ou seja, a velocidade de extensão) seria aproximadamente a mesma para os três casos.

Nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 são mostradas os mesmos gráficos das Figuras 5.5, 5.6 e 5.7, porém agora mantendo v_s constante no valor de $1,5 \mu\text{m s}^{-1}$ e variando k_1 , que é o parâmetro que representa a constante da reação de primeira ordem de formação de biomassa fúngica e que também é um parâmetro incerto em relação aos demais da Tabela 5.1. O valor de k_1 , originalmente estabelecido como sendo $0,01 \text{ s}^{-1}$, foi reduzido à metade (k_1 de $0,005 \text{ s}^{-1}$) e também dobrado (k_1 de $0,02 \text{ s}^{-1}$).

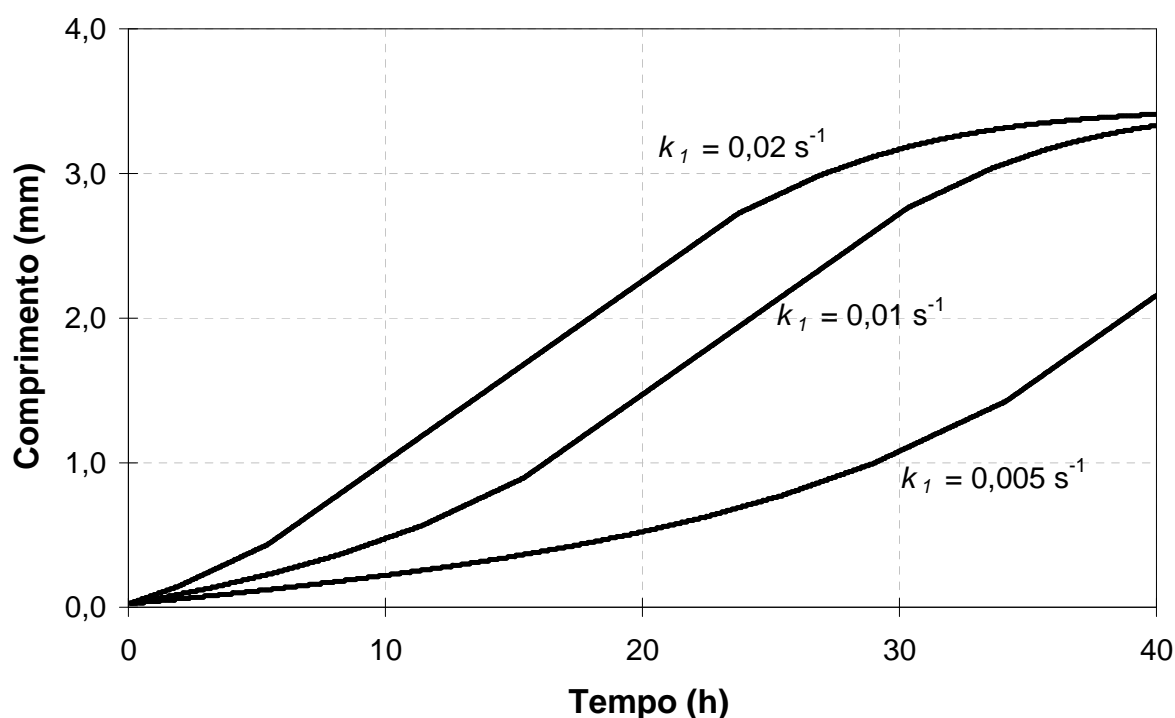


FIGURA 5.8 – COMPRIMENTO DE UMA ÚNICA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIFERENTES VALORES DE k_1

Quanto ao comprimento da hifa em função do tempo, observa-se que, ao reduzir o valor de k_1 pela metade, o comprimento máximo atingido em 40 h é menor, mas não chega a ser metade do comprimento atingido em 40 h com o valor original de k_1 (figura 5.8). Em 20 h, entretanto, o comprimento é aproximadamente um terço do comprimento padrão. Por outro lado, ao dobrar o valor de k_1 , a influência do parâmetro não é significativa em relação ao comprimento máximo atingido em 40 h, possivelmente porque, em hifas compridas, o crescimento começa a ser controlado pela baixa concentração de glucose na ponta.

Quanto às curvas de concentração de glucose no tanque da ponta em função do tempo e em função do comprimento (Figuras 5.9 e 5.10), observa-se que o parâmetro k_1 não altera o formato delas, mas apenas as desloca na vertical ou na horizontal (ou em ambos os sentidos). Quanto maior o valor de k_1 , menor a altura do pico obtido para a concentração de glucose na ponta da hifa e mais cedo este pico ocorreu.

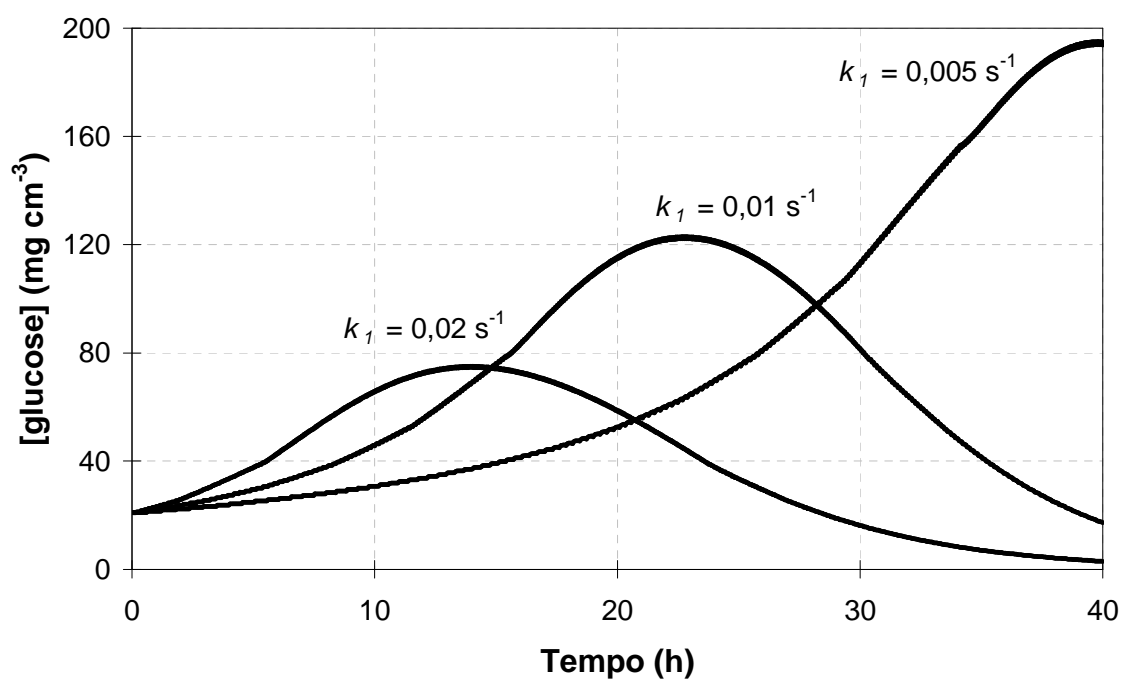


FIGURA 5.9 – CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NO TANQUE DA PONTA DA HIFA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA DIFERENTES VALORES DE k_1

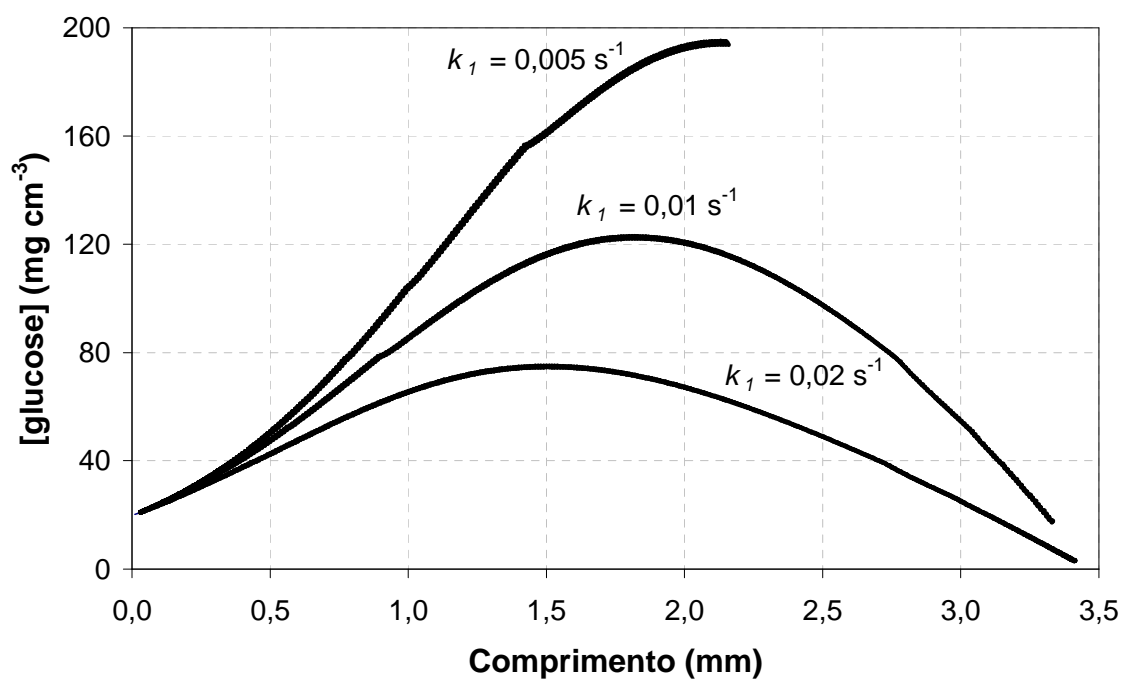


FIGURA 5.10 – CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE NO TANQUE DA PONTA DA HIFA EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DA HIFA ATÉ 40 h PARA TRÊS DIFERENTES VALORES DE k_1

Quanto maior o valor de k_1 , maior é a velocidade de consumo na ponta. Como o balanço de glucose na ponta depende da velocidade de chegada de glucose na ponta menos a velocidade de consumo, o termo de consumo de glucose vai atingir um valor igual ao termo de chegada com uma concentração menor de glucose e, por isso, a concentração máxima na ponta é também menor.

Por outro lado, com um menor valor de k_1 , o crescimento fica limitado pelo valor deste parâmetro, que vai ocasionar uma baixa velocidade de extensão. Neste caso, o menor comprimento atingido não é porque a glucose está chegando lentamente na ponta, mas sim porque o seu consumo para extensão é lento. Entretanto, como o acúmulo na ponta é elevado até 40 h, o potencial de crescimento da hifa ainda é grande e, neste caso, se mais tempo fosse simulado, a hifa continuaria a crescer.

5.3 DISCUSSÃO

Há dois modelos na literatura que apresentam características semelhantes às daquelas do modelo desenvolvido neste capítulo: o modelo de López-Isunza, Larralde-Corona e Viniegra-González (1997), que descreve o crescimento de uma única hifa sobre um meio sólido, e o modelo de Davidson e Olsson (2000), que descreve o desenvolvimento de micélio fúngico a partir de uma fonte isolada de nutrientes. Nas duas seções que seguem, o modelo desenvolvido neste capítulo será comparado a estes modelos. Em seguida, os mecanismos de transporte no interior da hifa serão discutidos. Por fim, possíveis extensões e modificações do modelo e sugestões para trabalhos futuros serão apresentadas.

5.3.1 Desenvolvimento de uma Única Hifa

Como foi feito no modelo desenvolvido no presente trabalho, o modelo de López-Isunza, Larralde-Corona e Viniegra-González (1997) foi proposto para descrever a extensão de uma única hifa. Entretanto, diferentemente deste trabalho, em que a hifa se estendia acima da superfície, no sistema modelado por eles a hifa estendia horizontalmente sobre a superfície. O esquema do sistema modelado pelos autores é mostrado na Figura 5.11. Para este sistema, eles propuseram um conjunto de equações do tipo difusão-reação para o substrato no meio externo (S_m); o transporte através da membrana com absorção e liberação do substrato através de um carreador específico (A); e difusão, convecção e reação do substrato (S) no interior da hifa, sendo que neste último caso a reação envolvia a formação de precursores (P) a partir do substrato, os quais posteriormente eram incorporados à parede da hifa na ponta da mesma (espécie Q).

As equações em si não serão aqui discutidas, visto que as diferenças em relação ao modelo dos tanques em série aqui desenvolvido não residem tanto nas reações propostas ou no formato das equações de transporte. A principal diferença é que no sistema mostrado na Figura 5.11 a hifa se desenvolvia sobre o meio sólido (de maneira superficial) e podia absorver substrato ao longo de todo o seu

comprimento, enquanto no presente trabalho existia uma única fonte de nutrientes na origem da hifa. Com esta absorção ao longo de toda a hifa, as previsões do modelo de López-Isunza, Larralde-Corona e Viniegra-González (1997) não foram significativamente influenciadas pelo termo convectivo, e os perfis de comprimento da hifa em função do tempo pouco diferiram entre si ao variar a velocidade do fluxo convectivo. Como mais substrato podia ser absorvido ao longo da hifa, o transporte dele por meio de difusão apenas, tanto através da membrana quanto ao longo da hifa, seria suficiente para suprir as necessidades de crescimento da hifa. No caso dos resultados apresentados neste capítulo, observa-se que o fluxo convectivo não pôde ser desprezado e apresenta grande influência sobre o transporte de nutrientes e comprimento atingido pela hifa. Este fato leva à conclusão de que, quando a hifa está banhada em nutrientes, o fluxo convectivo não é importante. Entretanto, quando o nutriente somente entra na hifa numa região longe da ponta, a presença do fluxo convectivo torna-se relevante para o crescimento da hifa.

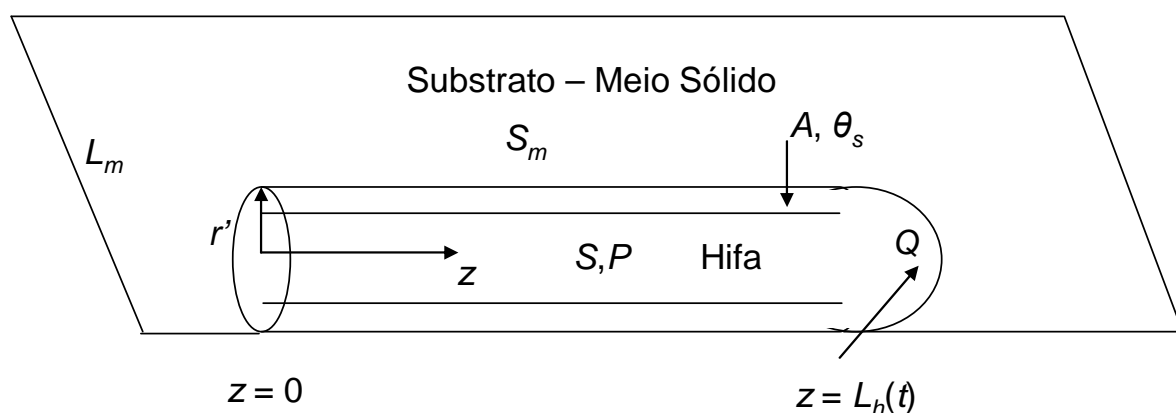


FIGURA 5.11 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS REGIÕES ONDE OCORREM TRANSFERÊNCIA DE MASSA E CINÉTICA DE CRESCIMENTO NO MODELO DE LÓPEZ-ISUNZA, LARRALDE-CORONA E VINIEGRA-GONZÁLEZ (1997)

Os símbolos são: S_m , substrato no meio sólido; (A, θ_s) carreador e complexo carreador-substrato na membrana; (S, P) substrato e precursor de parede dentro da hifa; (Q) espécie absorvida na ponta para produzir nova parede; L_m comprimento do meio onde ocorre difusão – tipicamente equivalente ao raio de uma placa de Petri - e L_h o comprimento da hifa, como função do tempo.

O modelo de López-Isunza, Larralde-Corona e Viniegra-González (1997) foi resolvido até um tempo de 15 h e o comprimento da hifa validado com dados experimentais de crescimento de *Aspergillus niger* sobre o meio em diferentes

concentrações de glucose. O fato é que, até este tempo, apenas a aceleração do crescimento da hifa é observado, e não a desaceleração. Assim, em comparação com a simulação mostrada na Figura 5.2, o modelo desses autores não previu a desaceleração do crescimento fúngico. Entretanto, como o sistema é diferente, não se pode dizer que a desaceleração ocorreria no mesmo tempo, visto que os fenômenos que causariam a desaceleração não seriam os mesmos. No presente trabalho, a desaceleração do crescimento ocorre porque a velocidade com a qual a glucose chega na ponta é baixa, ocasionando uma baixa velocidade de formação de biomassa.

No modelo desenvolvido por López-Isunza, Larralde-Corona e Viniegra-González (1997) foi assumida uma hifa cilíndrica, com difusão não somente na dimensão axial, mas também na dimensão radial. Com isso, foram necessárias técnicas mais sofisticadas para a resolução do conjunto de EDPs propostas (neste caso específico, foi utilizada a técnica da colocação ortogonal). Além de tornar o problema matematicamente custoso, a difusão axial provavelmente é irrelevante na escala tão pequena que é a do diâmetro da hifa. Lew (2005), por exemplo, ao observar o movimento de vacúolos no interior de uma hifa de *Neurospora crassa*, não observou, visualmente, indicações de turbulência. Além disso, esse mesmo autor calculou o número de Reynolds para este escoamento e determinou que ele estava bem abaixo do valor limite a partir do qual o escoamento é turbulento. López-Isunza, Larralde-Corona e Viniegra-González (1997) não mostraram qualquer perfil radial de concentração de nutrientes, o que leva a hipotetizar que eles, provavelmente, não foram significativos e, portanto, a condição de mistura perfeita para os tanques em série do modelo deste capítulo é aceitável.

Outra vantagem do sistema dos tanques em série em relação ao sistema de López-Isunza, Larralde-Corona e Viniegra-González (1997) é que a característica discreta do sistema permite mais facilmente a associação com eventos de ramificação e permite também uma divisão de segmentos diferentes de hifa em estados fisiológicos diferentes. Como descrito na revisão bibliográfica (seção 2.3.2), os modelos discretos permitem a representação explícita da ramificação, fenômeno difícil de ser descrito por um conjunto de EDPs.

5.3.2 Desenvolvimento fúngico a partir de uma fonte de nutrientes isolada

O modelo proposto por Davidson e Olsson (2000) descreveu o crescimento fúngico de um micélio em cima de um suporte sólido não nutritivo a partir de uma fonte de substrato situada no local de inoculação, sem mais absorção ao longo do comprimento da hifa (desenho esquemático representado na Figura 2.6). Os autores propuseram um modelo envolvendo três variáveis: substrato externo (localizado somente na origem, que variava com o tempo e era internalizado através de transporte ativo), substrato interno que era translocado por difusão apenas ou difusão mais transporte ativo e era consumido; e biomassa, que era produzida a partir do substrato interno (equações 2.7, 2.6 e 2.5, respectivamente). Os autores mostraram perfis de extensão a partir do ponto de inoculação e perfis de concentração de uma molécula “sonda” em função do comprimento e compararam estes últimos com dados experimentais obtidos por Persson, Olsson e Jansson (2000) (dados estes mostrados na Figura 2.7). Os dados experimentais obtidos por eles foram da distribuição da sonda radioativa de 3-O-metilglucose. Esta sonda, segundo eles, não é metabolizada pelo fungo, não pode ser incorporada em compostos estruturais, como a parede celular, e não pode funcionar como substrato respiratório e, com isto, segundo os autores, refletiria o *pool* de glucose dentro da célula. Esta afirmação, entretanto, é questionável, já que o substrato interno, ao contrário, é consumido ao longo da hifa e é incorporado ao material que a compõe. Portanto, o perfil da concentração do substrato interno em função do comprimento pode diferir do perfil da molécula sonda. Davidson e Olsson (2000) não exibiram os perfis simulados de substrato interno como função do comprimento para vários tempos, apenas os perfis para esse marcador radioativo.

As simulações do modelo foram feitas sem e com a presença de um termo convectivo e ativo de transporte de substrato. O termo de fluxo convectivo de substrato interno da equação proposta pelos autores é mostrado na equação 2.9 e da sonda, que não era consumida, é mostrado na equação 2.10. Sem este termo, apenas a difusão seria o mecanismo de transporte e o modelo previu perfis diferentes dos perfis experimentais. A presença do termo de transporte convectivo e ativo foi primordial para a obtenção de perfis simulados de distribuição da sonda em função da distância semelhantes aos perfis experimentais.

Em relação ao modelo desenvolvido neste capítulo, o principal ponto de diferença do modelo de Davidson e Olsson (2000) é o formato do termo convectivo (segundo termo do lado direito da equação 2.9). No caso proposto pelos autores, esse termo era “ativo”, no sentido de que dependia da concentração de substrato e envolvia gasto de energia. No modelo dos tanques em série, o fluxo convectivo não depende da concentração de substrato, mas sempre ocorre em uma mesma direção (da fonte de nutrientes para a hifa crescente), devido à evaporação de água na ponta. Aí residem as diferenças nos perfis que foram obtidos neste trabalho e nos perfis obtidos por Davidson e Olsson (2000), já que eles conseguiram perfis semelhantes aos dados experimentais mostrados na Figura 2.7 ao modelar o transporte da molécula sonda. Na Figura 2.7, vê-se que há um pico de concentração da sonda em uma distância atrás da ponta. No modelo desenvolvido neste capítulo o pico de concentração sempre ocorria na ponta da hifa (Figuras 5.5 e 5.7, por exemplo).

Vale destacar também que, no modelo aqui desenvolvido, apenas uma única hifa foi modelada, ao passo que em Davidson e Olsson (2000) a biomassa fúngica foi modelada de uma forma contínua (densidade de biomassa em função da distância a partir do ponto de inoculação). Se no modelo deles a densidade podia variar, então a quantidade da sonda em uma dada posição dependia não somente da concentração da sonda no citoplasma naquela posição, mas também da quantidade de biomassa naquela posição. No modelo aqui desenvolvido, talvez com muitas hifas crescendo simultaneamente (mas não necessariamente de maneira idêntica), os perfis de glucose em função da altura do modelo dos tanques em série possa apresentar características semelhantes aos perfis da Figura 2.7.

No modelo dos tanques em série, a concentração de glucose na fonte era constante. Já Davidson e Olsson (2000) propuseram que o substrato externo era consumido na fonte e, portanto, esta não tinha uma concentração fixa. Uma fonte esgotável pode também ser incluída futuramente no modelo dos tanques em série.

Davidson e Olsson (2000) sugeriram que, sobre pequenas distâncias (até 1 cm), a inclusão de um termo de translocação ativa não fornece grandes vantagens sobre a difusão. Entretanto, em distâncias maiores, o mecanismo passivo não foi suficiente para sustentar a expansão contínua e, para os autores, isso sugere que a colônia deve gastar energia para translocar os nutrientes dentro do micélio. As distâncias medidas experimentalmente por Nopharatana (1999) são menores, até

3,5 mm em 40 h de cultivo. Essas distâncias, entretanto, referem-se a hifas aéreas e de um fungo diferente, o *Rhizopus oligosporus* (um zigomiceto). Neste capítulo, mostrou-se que a difusão era suficiente para sustentar um crescimento até uma altura de 1 mm e, para que a hifa atingisse a altura de 3,5 mm, o termo convectivo teve que ser incluído. Isto está de acordo com Cairney (2005) que disse que a translocação pode ser dirigida por diferentes mecanismos em fungos diferentes, ou mesmo que estes mecanismos podem variar dentro de uma mesma espécie fúngica dependendo das condições ambientais. Os mecanismos de transporte serão discutidos na próxima seção.

5.3.3 Mecanismos de Transporte

Neste trabalho, foi proposto que água é perdida pela ponta da hifa devido à evaporação (transpiração). Isto foi feito de acordo com as proposições de Jennings (1995) de que a evaporação a partir de uma hifa pode aumentar a velocidade de translocação dentro dela. Segundo o autor, a água pode ser perdida rapidamente através de esporóforos, que são as estruturas reprodutivas de basidiomicetos. A taxa de perda de água pode ser similar àquele de uma superfície de água livre. O controle sobre a perda de água estaria relacionado com a espessura da camada sobre o esporóforo, sendo a espessura desta camada dependente da turbulência do ar ao redor. Vale destacar, entretanto, que a superfície de alguns fungos pode ser hidrofóbica, e, então, há a formação de gotículas, e não camada, sobre a superfície. Para Jennings (1995), se a água pode ser rapidamente perdida de esporóforos de basidiomicetos, em certas circunstâncias, o fluxo de água através destas estruturas poderia aumentar a velocidade de crescimento. Nestas circunstâncias, ele presumiu que o aumento do fluxo de água carregaria nutrientes para as pontas dos esporóforos.

Até onde se conhece a literatura, nenhum modelo de crescimento fúngico incorporou a evaporação da água da hifa. O modelo dos tanques em série desenvolvido neste capítulo mostrou que a sugestão de Jennings (1995), de que a evaporação de água poderia aumentar a velocidade de crescimento, se realmente ocorrer em hifas fúngicas, pode ser verdadeira para o crescimento de hifas aéreas

de *Rhizopus oligosporus*. Além disso, comparando o modelo deste capítulo com o modelo desenvolvido no capítulo 4, ficou evidente de que essa evaporação é importante para o crescimento das hifas reprodutivas que alcançam 3,5 mm de altura, ao passo que a difusão sozinha seria somente suficiente para sustentar o crescimento das hifas que foram chamadas de vegetativas (altamente densas até 1 mm de altura).

Jennings (1995) também descreveu que o crescimento de esporóforos pode ocorrer mesmo com ar saturado ao redor, já que podem existir gradientes significativos de pressão dentro da hifa. Isto indica movimento de água devido ao turgor, que pode ser decorrente de gradientes osmóticos. Segundo Jennings (1995) não há porque este fluxo de água não carregar nutrientes.

O transporte devido à evaporação e ao turgor é unidirecional. Por outro lado, a difusão de nutrientes e o transporte ativo modelado por Davidson e Olsson (2000) permitem fluxos de nutrientes em duas direções e a realocação de nutrientes dentro da rede do micélio a partir de regiões em excesso para regiões com escassez de nutrientes. Olsson (1995) demonstrou que vários fungos exibem estes dois mecanismos (difusão e transporte ativo). O transporte ativo não foi incluído no modelo dos tanques em série, mas pode ser facilmente incorporado em trabalhos futuros, da maneira que Davidson e Olsson (2000) fizeram, ao considerar que a velocidade de convecção é proporcional à concentração de glucose.

Os mecanismos energéticos por trás da evaporação não foram incluídos no modelo e não serão discutidos, já que o objetivo deste modelo não era entender “de onde” o fungo obtém a energia necessária, mas, sim, determinar se a inclusão de um mecanismo convectivo alterava significativamente os resultados. O papel da convecção como mecanismo de transporte ainda não havia sido estudado especificamente para as hifas aéreas. Os trabalhos feitos até então e discutidos até aqui se referem ou ao crescimento sobre meio semi-sólido em colônia ou ao crescimento em solo, no qual as hifas se desenvolvem sobre ele e podem adquirir nutrientes em locais alcançados pela ponta e necessitam redistribuí-los dentro do micélio. O sistema envolvido neste trabalho, das hifas aéreas que crescem a partir de um meio para a fase gasosa, portanto, é diferente do sistema de fungos crescendo sobre o solo. A evaporação da água torna-se relevante para as hifas aéreas, visto que a superfície de contato com o ar circundante é maior do que em hifas superficiais.

Como conclusão, pode-se hipotetizar que há fluxo convectivo nas hifas aéreas de *Rhizopus oligosporus*, visto que com o mecanismo de difusão puro simplesmente não haveria como fornecer matéria rapidamente o suficiente para permitir que a hifa alcançasse a altura de 3,5 mm em 40 h. Na ausência de dados experimentais que permitam a validação do modelo, sugere-se que seja feita a determinação experimental da distribuição de um composto chave interno a hifas aéreas em função da altura atingida por estas hifas a partir do meio sobre o qual se desenvolvem. No transporte da escala do micrômetro ao milímetro, a técnica da Recuperação de Fluorescência após Fotodegradação (*Fluorescence Recovery after Photobleaching* – FRAP) pode ser utilizada para o estudo do transporte de nutrientes através de vacúolos que são transportados no interior da hifa até a ponta crescente, e os quais transportam nutrientes em alta concentração no seu interior (FRICKER *et al.*, 2008). Na escala do milímetro ao centímetro, a investigação através do monitoramento do movimento de compostos marcados radioativamente dentro do micélio (FRICKER *et al.*, 2008) talvez possa ser utilizada para a distribuição de nutrientes em hifas aéreas, mas, até o momento, isto foi utilizado apenas para hifas superficiais.

5.3.4 Possíveis Modificações e Extensões do Modelo e Sugestões para Trabalhos Futuros

O sistema dos tanques em série desenvolvido neste capítulo, além de permitir a analogia com o modelo desenvolvido no capítulo 4, é flexível o suficiente para que um sistema fisiológico complexo como o da hifa possa ser modelado. A seguir serão descritos algumas outras características ou situações que podem ser simuladas utilizando o sistema desenvolvido neste capítulo:

- apenas a glucose, a fonte de carbono, foi proposta como promotora do crescimento. Sabe-se, entretanto, que a fonte de nitrogênio e a relação C:N é de importância para o desenvolvimento fúngico. A presença de um composto representando a fonte de nitrogênio pode ser incorporada ao modelo;

- ainda na questão nutricional, a produção de enzimas no interior da hifa e transporte intracelular até à membrana com posterior secreção e reação com o polímero podem ser incorporados;
- a absorção de nutrientes foi modelada como ocorrendo por difusão e convecção. É possível estender o modelo para que exista um transporte através da parede e da membrana e a velocidade de absorção de nutrientes poderia depender de um carreador, por exemplo;
- a absorção de nutrientes também pode ser modelada como um transporte ativo, com gasto de nutrientes;
- a translocação dos nutrientes no interior da hifa pode ser modelada por um transporte ativo, como feito por Davidson e Olsson (2000);
- no modelo, a hifa transpira apenas na ponta. A transpiração pode ser modelada de modo a ocorrer em outro ponto específico, que não necessariamente a ponta da hifa. Isto poderia dirigir o transporte de nutrientes para esse ponto específico e, com isso, possam talvez ser obtidos perfis como os da Figura 2.7, nos quais há acúmulo de nutrientes em algum ponto no meio da hifa;
- a reação de síntese de biomassa, no modelo desenvolvido, é restrita ao último tanque. É possível estender o modelo para ter vários tanques ao lado da ponta fazendo a reação de síntese, com o transporte da biomassa sintetizada neles até o tanque da ponta. Isto simularia uma maior zona subapical de síntese de precursores;
- a hifa foi modelada por tanques cúbicos e que “apareciam” na ponta dela, a fim de fazer analogia com o modelo dos autômatos celulares. O sistema pode ser adaptado para uma hifa cilíndrica e/ou que estende suavemente ao incorporar uma equação que descreve a variação do volume com o tempo, e então outras situações, que não somente o desenvolvimento das hifas aéreas, poderiam ser exploradas.

O maior desafio do modelo desenvolvido neste capítulo ainda permanece: incorporá-lo ao modelo desenvolvido no capítulo 4. A lógica da junção é simples: um “cubo” qualquer preenchido por biomassa no modelo dos autômatos teria que ter

pelo menos dois vizinhos identificados da mesma hifa para que o balanço de glucose fosse feito. Entretanto, como as hifas podem ramificar, as equações podem estar interligadas por mais de dois cubos. Além disso, em uma altura altamente densa, por exemplo, milhares de cubos estariam preenchidos por biomassa e milhares de EDOs teriam que ser resolvidas simultaneamente. É provável que o modelo resultante seja difícil demais para resolver em um computador simples, e uma alta capacidade de processamento seja necessária.

Mesmo sem interligar os modelos, os sistemas desenvolvidos são flexíveis o suficiente para estudar diversas situações do crescimento fúngico e permitiram levantar questões importantes sobre o desenvolvimento das hifas aéreas, questões estas que serão descritas na próxima seção.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação apresentou dois modelos que permitiram um maior entendimento dos mecanismos de desenvolvimento de hifas aéreas sobre superfícies úmidas e nutritivas em contato com o ar: um modelo discreto (autômatos celulares) que descreveu o crescimento tridimensional do micélio fúngico, levando em consideração os aspectos físicos e espaciais da distribuição das hifas; e um modelo de tanques em série, que descreveu o crescimento de uma única hifa fúngica, incorporando diferentes mecanismos de transporte de nutrientes no interior dela. A seguir serão sumarizadas as principais conclusões obtidas. Extensões e modificações dos modelos e sugestões para trabalhos futuros foram feitas na discussão de cada sistema (seções 4.3.3. e 5.3.4).

O modelo discreto desenvolvido para o crescimento do micélio fúngico no ar acima da superfície foi o primeiro modelo a utilizar esta estratégia para modelar as hifas aéreas. Apesar de ele ter sido desenvolvido em um sistema do tipo *lattice-based*, as pontas das hifas podiam se mover quase tão livremente como em um sistema do tipo *lattice-free*. Este fato foi aliado a um conjunto de regras para o desenvolvimento de duas populações fúngicas: uma do tipo vegetativa, com tendência a se ramificar mais e crescer em alturas de até 1 mm; e outra que foi chamada de reprodutiva, que se ramificava menos e tinha uma velocidade maior de extensão, atingindo alturas maiores. O fato de o modelo ter descrito razoavelmente os dados experimentais não comprova que estas são as regras que governam o crescimento fúngico, mas sugere que o desenvolvimento de duas populações de hifas, com características distintas, pode explicar os perfis experimentais de densidade de biomassa em função da altura obtidos por Nopharatana (1999). Além disso, essas populações podem ter diferentes características de translocação de nutrientes, como foi sugerido pelo modelo dos tanques em série.

O papel da evaporação de água como mecanismo de translocação de nutrientes em hifas aéreas ainda não havia sido estudado por meio de modelos matemáticos. A modelagem de uma única hifa através de tanques em série permitiu a proposição da hipótese de que uma difusão simples não seria capaz de transportar nutrientes até à ponta das hifas aéreas de *Rhizopus oligosporus* a uma velocidade suficiente para permitir que as hifas atingissem as alturas que foram obtidas

experimentalmente. Isto sugere que mecanismos de transporte convectivo de nutrientes são imprescindíveis de serem incorporados neste tipo de sistema, mas foram desprezados na literatura nas abordagens de modelagem matemática propostas para ele.

Ao observar os dois modelos em conjunto, pode-se sugerir que no sistema estudado há o desenvolvimento de duas populações fúngicas. A primeira delas, do tipo vegetativo, transloca nutrientes em seu interior apenas por difusão, é altamente ramificada e explica as altas densidades obtidas experimentalmente até 1 mm. A outra população, chamada de hifas reprodutivas, transpira, e isso ocasiona a translocação de nutrientes para a ponta mais rapidamente, de modo que uma maior velocidade de crescimento é obtida e as hifas crescem até altura maiores.

As conclusões obtidas no trabalho foram através de estudos matemáticos. A comprovação dos resultados obtidos só pode ser feita se mais dados experimentais forem obtidos. A dificuldade em manter o arranjo tridimensional das hifas aéreas durante as análises é um dos principais pontos que dificultam a obtenção destes dados.

REFERÊNCIAS

- ATLAS, R. M. **Handbook of microbiological media for the examination of food**. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- AURIA, R.; ORTIZ, I.; VILLEGAS, E.; REVAH, S. Influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations. **Process Biochemistry**, v. 30(8), p. 751-756, 1995.
- BOSWELL, G.P. Modelling mycelial networks in structured environments. **Mycological Research**, v. 112, p. 1015-1025, 2008.
- BOSWELL, G.P.; HOPKINS, S. Linking hyphal growth to colony dynamics: spatially explicit models of mycelia. **Fungal Ecology**, v. 1(4), p. 143-154, 2008.
- BOSWELL, G.P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F.A.; GADD, G.M.; RITZ, K. Functional consequences of nutrient translocation in mycelial fungi. **Journal of Theoretical Biology**, v. 217(4), p. 459-477, 2002.
- BOSWELL, G.P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F.A.; GADD, G.M.; RITZ, K. Growth and function of fungal mycelia in heterogeneous environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 65, p. 447-477, 2003a.
- BOSWELL, G.P.; JACOBS, H.; RITZ, K.; GADD, G.M.; DAVIDSON, F.A. A mathematical approach to studying fungal mycelia. **Mycologist**, v. 17(4), p. 165-171, 2003b.
- BOSWELL, G.P.; JACOBS, H.; RITZ, K.; GADD, G.M.; DAVIDSON, F.A. The development of fungal networks in complex environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 69(2), p. 605-634, 2007.
- BULL, A.T.; TRINCI, A.P.J. The physiology and metabolic control of fungal growth. **Advances in Microbial Physiology**, v. 15, p. 1-84, 1977.
- CAIRNEY, J.W.G. Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. **Mycological Research**, v. 109, p. 7-20, 2005.
- CARLILE, M.J. The success of the hypha and mycelium. *In*: GOW, N.A.R.; GADD, G.M. (Ed.). **The Growing Fungus**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 3-20.
- CARVER, I.; BOSWELL, G.P. A lattice-free model of translocation-induced outgrowth in fungal mycelia. **International Journal of Applied Mathematics**, v. 38(4), p. 173-179, 2008.
- DAVIDSON, F.A. Modelling the qualitative response of fungal mycelia to heterogeneous environments. **Journal of Theoretical Biology**, v. 195, p. 281-291, 1998.

DAVIDSON, F.A. Mathematical modeling of mycelia: a question of scale. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 30-41, 2007.

DAVIDSON, F.A.; OLSSON, S. Translocation induced outgrowth of fungi in nutrient-free environments. **Journal of Theoretical Biology**, v. 205, p. 73-84, 2000.

DAVIDSON, F.A.; SLEEMAN, B.D.; RAYNER, A.D.; CRAWFORD, J.W.; RITZ, K. Context-dependent macroscopic patterns in growing and interacting mycelia networks. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 263, p. 873-880, 1996.

EDELSTEIN, L. The propagation of fungal colonies: a model for tissue growth. **Journal of Theoretical Biology**, v. 98, p. 679-701, 1982.

EDELSTEIN, L.; SEGEL, L.A. Growth and metabolism in mycelial fungi. **Journal of Theoretical Biology**, v. 104, p. 187-210, 1983.

EDELSTEIN, L.; HADAR, Y.; CHET I.; HENIS, Y.; SEGEL, L.A. A model of fungal colony growth applied to *Sclerotium rolfii*. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 1873-1881, 1983.

FRICKER, M.D.; LEE, J.A.; BEBBER, D.P.; TLALKA, M.; HYNES, J.; DARRAH, P.R.; WATKINSON, S.C.; BODDY, L. Imaging complex nutrient dynamics in mycelial networks. **Journal of Microscopy**, v. 231, p. 317-331, 2008.

GARDNER, M. Mathematical games: the fantastic combination of John Conway's new solitaire game of life. **Scientific American**, v. 223, p. 120-123, 1970.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1996.

GOW, N.A.R. Tip growth and polarity. In: GOW, N.A.R.; GADD, G.M. (Ed.). **The Growing Fungus**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 277-300.

HARRIS, S.D. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. **Mycologia**, v. 100(6), p. 823-832, 2008.

HAYDUK, W.; LAUDIE, H. Prediction of diffusion coefficients for non-electrolytes in dilute aqueous solutions. **AIChE Journal**, v. 20, p. 611-615, 1974.

HUTCHINSON, S.A.; SHARMA, P.; CLARKE, K.R.; MacDONALD, I. Control of hyphal orientation in colonies of *Mucor hiemalis*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 75, p. 177-191, 1980.

JENNINGS, D.H. **The physiology of fungal nutrition**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

KÁROLYI, G. Fractal scaling of microbial colonies affects growth. **Physical Review E**, v. 71(3), 031915, 2005.

KENNES, C.; VEIGA, M.C. Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 305-319, 2004.

LASZLO, J.A.; SILMAN, R.W. Cellular-automata simulations of fungal growth on solid substrates. **Biotechnology Advances**, v. 11(3), p. 621-633, 1993.

LEW, R.R. Mass flow and pressure-driven hyphal extension in *Neurospora crassa*. **Microbiology**, v. 151, p. 2685-2692, 2005.

LÓPEZ-ISUNZA, F.; LARRALDE-CORONA, C.P.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. **Chemical Engineering Science**, v. 52, p. 2629-2639, 1997.

MEDWID, R.D.; GRANT, D.W. Germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48(6), p. 1067-1071, 1984.

MEŠKAUSKAS, A.; FRICKER, M.D.; MOORE, D. Simulating colonial growth of fungi with the Neighbour-Sensing model of hyphal growth. **Mycological Research**, v. 108(11), p. 1241-1256, 2004a.

MEŠKAUSKAS, A.; McNULTY, L.J.; MOORE, D. Concerted regulation of all hyphal tips generates fungal fruit body structures experiments with computer visualizations produced by a new mathematical model of hyphal growth. **Mycological Research**, v. 108, p. 341-353, 2004b.

MITCHELL, D.A.; von MEIEN, O.F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F.D.H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, p. 15-26, 2004.

NIELSEN, J. Modelling the growth of filamentous fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 46, p. 188-223, 1992.

NIELSEN, J. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 14(11), p. 438-443, 1996.

NOPHARATANA, M. **Microscale studies of fungal growth in solid state fermentation**. Tese (Doctor of Philosophy in Chemical Engineering) – Department of Chemical Engineering, University of Brisbane, Brisbane, 1999.

NOPHARATANA, M.; HOWES, T.; MITCHELL, D.A. Modelling fungal growth on surfaces. **Biotechnology Techniques**, v. 12(4), p. 313-318, 1998.

OLIVER, S.G.; TRINCI, A.P. Modes of growth of bacteria and fungi. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. New York: Pergamon Press, 1985. v. 1, p. 159-185.

OLSSON, S. Mycelial density profiles of fungi on heterogeneous media and their interpretation in terms of nutrient reallocation patterns. **Mycological Research**, v. 99, p. 143-153, 1995.

OLSSON, S.; JENNINGS, D.H. Evidence for diffusion being the mechanism of translocation in the hyphae of three molds. **Experimental Mycology**, v. 15, p. 302-309, 1991.

PERSSON, C.; OLSSON, S.; JANSSON, H.B. Growth of *Arthrobotrys superba* from birch wood food base into soil determined by radioactive tracing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 47-51, 2000.

PROSSER, J.I. Growth of fungal branching systems. **Mycologist**, v. 4, p. 60-65, 1990.

PROSSER, J.I. Kinetics of filamentous growth and branching. *In*: GOW, N.A.R.; GADD, G.M. (Ed.). **The Growing Fungus**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 301-317.

PROSSER, J.I.; TOUGH, A.J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 10(4), p. 253-274, 1991.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24(2), p. 161-177, 2006.

RAHARDJO, Y.S.P.; WEBER, F.J.; HAEMERS, S.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 36(7), p. 900-902, 2005.

RAJAGOPALAN, S.; MODAK, J.M. Evaluation of relative growth limitation due to depletion of glucose and oxygen during fungal growth on a spherical solid particle. **Chemical Engineering Science**, v. 50, p. 803-811, 1995.

REYNAGA-PEÑA, C.; GIERZ, G.; BARTNICKI-GACIA, S. Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 9096-9101, 1997.

RIQUELME, M.; BARTNICKI-GARCIA, S. Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 842-851, 2004.

SCHUTYSER, M.A.; PAGTER, P.; WEBER, F.J.; BRIELS, W.J.; BEOM, R.M.; RINZEMA, A. Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: experiments and modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83(5), p. 503-513, 2003.

STEELE, G.C.; TRINCI, A.P.J. Morphology and growth kinetics of hyphae of differentiated and undifferentiated mycelia of *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v. 91, p. 362-368, 1975.

TINDEMANS, S.H.; KERN, N.; MULDER, B.M. The diffusive vesicle supply center model for tip growth in fungal hyphae. **Journal of Theoretical Biology**, v. 238, p. 937-948, 2006.

TRINCI, A.P.J. Kinetics of apical and lateral branching in *Aspergillus nidulans* and *Geotrichum lactis*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 17-28, 1970.

TRINCI, A.P.J. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. **Journal of General Microbiology**, v. 67, p. 325-344, 1971.

TRINCI, A.P.J. A study of the kinetics of hyphae extension and branch initiation of fungal mycelia. **Journal of General Microbiology**, v. 81, p. 225-236, 1974.

WATTERS, M.K.; GRIFFITHS, A.J.F. Tests of a cellular model for constant branch distribution in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67(4), p. 1788-1792, 2001.

WIMPENNY, J.W.T; COLASANTI, R. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22(1), p. 1-16, 1997.

YANG, H.; REICHL, U.; KING, R.; GILLES, E.D. Measurement and simulation of the morphological development of filamentous microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39(1), p. 44-48, 1992.